

**Untersuchungen zum Reaktions-
chemismus und zur Methodik
der Bestimmung der Phosphatasen
im Serum**

ROLF LAMERZ

1967

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. SCHWIEGK

Untersuchungen zum Reaktionschemismus und zur
Methodik der Bestimmung der Phosphatasen im
Serum

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Höheren Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rolf L a m e r z
aus Düsseldorf

München 1967

Aus der I. Medizinischen Fakultät der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. SCHWIEGK

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. KNEDEL

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. SCHWIEGK

Dekan: Prof. Dr. M. KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 21.2.1967



GLIEDERUNG

A Einleitung

B Hauptteil

I Überblick über die Phosphatasen

a) Die Phosphatase als Enzym

- 1.) Enzym (Begriff u. Charakteristika)
- 2.) Die Phosphatasen in der system. Chemie

b) Physiologischer Standort der Phosphatasen im menschlichen Körper.

- 1.) lokal gebundene Phosphatasen
- 2.) Serumphosphatasen

c) Klinische Bedeutung der Serumphosphatasen

- 1.) die saure Serumphosphatase
- 2.) die alkalische Serumphosphatase

II Bestimmungsmethoden der Serumphosphatasen

a) Allgemeines

- 1.) Reaktionsprinzip
- 2.) Beeinflussende Faktoren

b) Beschreibung von Methoden

Methoden mit Substratverwendung von

- 1.) Na- β -Glycerophosphat
- 2.) Dinatriumphenylphosphat
- 3.) Phenolphthaleinphosphat
- 4.) p-Nitrophenylphosphat

c) Korrelation zwischen den verschiedenen Einheiten.

- 1.) Die internationale Aktivitätseinheit (Definition und Äquivalente)
- 2.) Umrechnung für die alkalische Phosphat.

d) Im Experiment verwandte Methoden

- 1.) Vollquantitative Methoden

α) saure Phosphatase

αα) Testcombination Fa. Boehringer

ββ) Phosphatabs-Methode I

γγ) Phosphatabs-Methode II
(Phosphatabs-Acid Quantitative)

β) alkalische Phosphatase

αα) Testcombination Fa. Boehringer

ββ) Phosphatabs-Methode I

γγ) Phosphatabs-Methode II
(Phosphatabs-Alkaline Quantitative)

2.) Halbquantitative Methoden

α) saure Phosphatase:

Phosphatabs-Acid-Schnellmethode

β) alkalische Phosphatase:

Phosphatabs-Alkaline-Schnellmethode

III Experimentelle Untersuchungen

a) Korrelation zwischen voll- und halbquantitativen Methoden

1.) Mathematische Berechnung der Umrechnungsdiagramme. Bezugseinheit.

α) saure Phosphatase

β) alkalische Phosphatase

2.) Das Untersuchungsmaterial
(Auswahlbedingungen und Ergebnisse)

α) saure Phosphatase

β) alkalische Phosphatase

3.) Diskussion

b) Versatol als Kontroll- bzw. Standardserum

1.) Versuchsergebnisse

2.) Ergänzende Bemerkungen und Diskussion

c) Chromatographische Lokalisation der Serumphosphatasen

1.) Fremduntersuchungen

2.) Eigenuntersuchungen

α) Methodik

β) Ergebnisse

A E I N L E I T U N G

Im Zuge der Objektivierung und Differenzierung klinischer Diagnosen hat die Kontrolle bestimmter Serumenzyme eine wichtige Bedeutung erlangt. So sind auch die Nachweismethoden für die alkalischen und sauren Serumphosphatasen in den letzten Jahren weiter ausgebaut worden und haben durch eine Fülle von unterschiedlichen Substraten und Maß-Einheiten eine verwirrende Mannigfaltigkeit erfahren. Angesichts dieser Entwicklung schien es uns angebracht, eine zusammenfassende Darstellung ihrer Enzymkinetik, ihrer klinisch-diagnostischen Aussagekraft sowie ihrer wichtigsten Bestimmungsmethoden einschließlich der Konvertierbarkeit der verschiedenen Maß-Einheiten zu geben.

Der Wert einer klinischen Untersuchungsmethode hängt nicht nur von der notwendigen Genauigkeit ihrer Aussage und ihrer Reproduzierbarkeit ab, sondern auch vom technischen Aufwand und der erforderlichen Arbeitszeit. Wir haben deshalb mit besonderem Interesse eine neue halbquantitative Schnellmethode an Hand zweier vollquantitativer Untersuchungsmethoden auf ihre Brauchbarkeit in der Klinik und Praxis geprüft. Dabei verwandten wir als Untersuchungsmaterial Patientenseren mit normalen und pathologisch erhöhten Enzymwerten sowie zwei neue Standardseren.

Schließlich zeigen wir an der Untersuchung einiger säulenchromatographisch-fraktionierter Seren eine nützliche Anwendungsmöglichkeit der Bestimmungsmethoden zur weiteren Differenzierung der Serumphosphatasen.

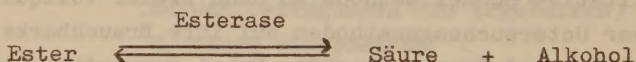
B H A U P T T E I L

I Überblick über die Phosphatasen

a) Die Phosphatasen als Enzym

Die Phosphatasen gehören chemisch zu den Enzymen oder Fermenten. Es ist deshalb zweckmäßig, sich einige Gesetzmäßigkeiten über sie ins Gedächtnis zurückzurufen.

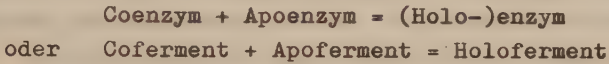
Die Enzyme sind die wichtigen Katalysatoren der lebenden Zelle. Dadurch greifen sie entscheidend in den Stoffwechsel des Organismus ein. Unter einem Katalysator verstehen wir einen Stoff, der die Reaktion zweier chemischer Stoffe, die sonst gar nicht oder nur in sehr geringem Maße miteinander reagieren, ermöglicht. Dabei ist er nicht selbst an dem Reaktionsprodukt beteiligt. So machen die Enzyme nicht nur chemisch labile (OSTWALD), sondern auch sehr stabile Verbindungen reaktionsfähig. Unter Aufhebung der Reaktionsträgheit katalysieren sie reversible Verbindungen nach beiden Seiten bis zum Erreichen eines gewissen Gleichgewichtszustandes, der durch die Gleichgewichtskonstante ihrer Reaktionsgleichung gegeben ist ⁽¹⁾:



Dabei wird ein Zustand verminderter potentieller (=freier) Energie angestrebt.

Die Moleküle chemischer Stoffe, die bei normaler Temperatur reaktionsträge sind, lassen sich durch Aktivierungsenergie (-wärme) in einen aktivierten Zustand überführen, aus dem heraus eine chemische Reaktion erfolgen kann. Hierbei steigt die Reaktionsgeschwindigkeit um das Zwei- bis Dreifache bei einer Temperatur-Erhöhung von 10°C (RG-Regel). Die Wirkung der Katalysatoren besteht darin, die Aktivierungsenergie herabzusetzen, so daß die Reaktionen schon bei Körpertemperaturen stattfinden können. Sie ermöglichen damit eine Einstellung des Gleichgewichts, nicht aber eine Verschiebung der Gleichgewichtslage! (2)

Ihrer chemischen Herkunft nach gehören die Enzyme zu den Proteinen oder Proteiden. Als Proteide lassen sie sich in einen Proteinanteil (Apoenzym) und eine hinzutretende "prosthetische Gruppe" (Coenzym) aufteilen:



Die fermentative Aktivierung ist sehr selektiv. Diese Substratspezifität liegt im Proteinanteil eines Enzyms verankert. Er trifft eine bestimmte Auswahl unter den umzusetzenden Stoffen. Oft ist er sogar wirkungsspezifisch und entscheidet über die Reaktion des Substratmoleküls (KARLSON).

Als Proteine unterliegen die Enzyme einem pH-Einfluß; die für sie günstigste H^+ -Konzentration bezeichnet man als ihr pH-Optimum. Wie erwähnt, fördert die Temperatur-Erhöhung wie bei nicht katalysierten Reaktionen die Geschwindigkeit der Umsetzungen (RGT-Regel). Diese Wirkung wird allerdings durch die Temperatur-Empfindlichkeit der Enzymproteine, welche zum größten Teil bei $40-50^{\circ}C$ irreversibel zerstört werden, eingeschränkt. Ionen spielen für die meisten Fermente eine entscheidende Rolle, indem sie entweder als Aktivatoren ihre Wirkung unterstützen oder sie als Inhibitoren aufheben.

Die systematische Chemie zählt die Phosphatasen zur Gruppe der Hydrolasen (hydrolytisch wirkende Enzyme), Untergruppe Esterasen. Sie spalten echte Esterbindungen zu Alkohol und Säure. Zu ihren Substraten gehören Nucleotide, Phosphatide, Zuckerphosphorsäuren usw. Weiterhin unterscheiden wir Phosphormonoesterasen, Phosphodiesterasen (spalten Verbindungen, bei denen zwei Hydroxylgruppen der Phosphorsäuren verestert sind), Pyrophosphatasen (spalten Anhydridbindungen der Phosphata). Unter isodynamen Phosphatasen verstehen wir Enzyme gleicher Substratspezifität, aber mit verschiedenem pH-Optimum: alkalische Phosphatasen (pH-Optimum 7-9,5) und saure Phosphatasen (pH-Opt. 4,5-6).

Hier interessieren nur die Phosphomonoesterasen. Es sind die Phosphatasen schlechthin. Sie spalten nur Monoester und greifen die 3'- und 5'-Monophosphate an. Diese hydrolytischen Phosphatasen sind grundsätzlich als Phosphoryltransferasen aufzufassen. Ihr Hauptacceptor ist Wasser, die übertragene Gruppe ist nicht die Phosphatgruppe $-O-P(=O)(OH)_2$, sondern die Phosphorylgruppe $-P(=O)(OH)_2$ (3).

Tabelle 1 führt Donator-Acceptor-Systeme für verschiedene organische Gewebe mit der zugehörigen pH-Abhängigkeit an. Tabelle 2 zeigt eine Differenzierung der Phosphomonoesterasen.

Tab.1: Phosphoryltransfer durch Phosphomonoesterasen
(nach AXELROD, Auszug³⁾)

Enzymquelle	pH	Donator	Acceptor
menschl.Urin	5,0	p-Nitrophenyl-P	einf. Alk.
Darmschleimhaut	8,5	Phosphokreatin	Glucose, Gly Fruktose
	8,5	Glucose-1'-P	Glycerin
	8,5	Phosphopyruvat	Glycerin
	8,5	p-Nitrophenyl-P	Glycerin
	8,5	Acetylphosphat	Glycerin
	8,5	ATP	Glycerin
Samen-	5,8	Phosphokreatin	Glycerin
flüssigkeit	5,8	Phosphopyruvat	Glycerin
	5,8	p-Nitrophenyl-P	Glycerin
	5,8	Acetylphosphat	Glycerin
Prostata	5,4	Phenolphthalein-P	einf. Alk.
	5,5	β -Glycerin-P	Glucose
	5,5	Phosphokreatin	Glucose

Tab.2: Einteilung der Phosphomonoesterasen
(Auszug³)

Bezeichnung	Vorkommen	pH-Opt.	aktivierbar durch	hemmbar durch
Alk. Phosph.	tier.Gewebe (Dünndarm- mucosa, Niere Knochen)	9,3	Mg ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ Co ⁺⁺ , Mn ⁺⁺	Cyanide SH-Verb.
1. saure Phosphatase	tier.Gewebe (Prostata)	5,4		F ⁻
2. s. Ph.	Schimmel- pilze, Hefe	3,8		Mg ⁺⁺
3. s. Ph.	Erythro- cyten, Unter- hefe	5,7	Mg ⁺⁺	

b) Physiologischer Standort der Phosphatasen im menschlichen Körper

Die Phosphomonoesterasen finden sich in Darmschleimhaut, Niere, Prostata, Knochen, Lunge, Leber, Pankreas, Milz, Muskeln, Gehirn, Hoden, Schilddrüse, Blut, Blutkörperchen, Harn usw. Ihre typischen Substrate sind: α -, β -Glycerinphosphorsäure, Phosphorsäureester des Phenols, p-Nitrophenols, Phenolphthaleins und z.B. des Fluoresceins und 4-Methyl-7-hydroxy-cumarins. Als metallische Aktivatoren fungieren: Mg⁺⁺, Zn⁺⁺, Co⁺⁺, Mn⁺⁺, Ni⁺⁺, Ca⁺⁺, Fe⁺⁺. Sie wirken als essentielle Co-Faktoren und beeinflussen die Stabilisierung der Enzymproteine.

Unter den ortsgebundenen Phosphatasen verdienen besondere Erwähnung:

Die Knochenphosphatase.

Ihr pH-Optimum liegt bei pH 9. Sie wurde 1923 von ROBINSON entdeckt. Sie tritt nur in Zonen auf, in denen sich Verknöcherungsprozesse abspielen, also in Röhrenknochen im Knorpel des Epiphysenspalts, nicht jedoch im hyalinen

Knorpel der Gelenke; beim embryonalen Skelett nur in später durch Knochen ersetzten knorpeligen Skeletteilen. Nach ROBINSON spielt das Enzym eine entscheidende Rolle bei der Ossifikation: durch Spaltung von organischen Phosphorsäureestern, die in den Osteoblasten gehäuft auftreten, bewirkt es eine zum Ausfällen des Calciumphosphats notwendige lokale Erhöhung der Phosphationenkonzentration.

Die Darmphosphatase.

Sie wurde 1912 von LEVENE und MEDIGRECEANU entdeckt. Sie ist im Oberflächenepithel lokalisiert, an Mikrosomen gebunden; auch die Darmmucosa ist reich an alkalischer Phosphatase. Sie spielt eine Rolle bei der Resorption der Zucker im Dünndarm.

Die Leberphosphatasen.

Man unterscheidet zwei alkalische (I+II) und zwei saure (Typ 1+2) Phosphatasen. Von den sauren überwiegt Typ 1. Es liegt eine ausgesprochene Substratspezifität vor: neben der o-Phosphoserinphosphatase (NEUBAUR, BYRNE, BORKENHAGEN, KENNEDY) findet man eine Fructose-1,6-di- und Glucose-6-phosphatase. Die letztere (HERS, DE DUVE), die außerdem in der Niere gefunden wird, ist in der Leber an Mikrosomen gebunden und hat ein pH-Optimum von 6,5. Sie steht in Beziehung zum Glykogengehalt der Leber. Die Glykogenspeicherkrankheit setzt ihre Aktivität herab, bei Cortisonbehandlung steigt sie an. - Die Fructose-1,6-diphosphatase (GOMORI) wird ebenfalls auch in der Niere angetroffen und besitzt ein pH-Optimum von 9,7. Mg^{++} und Mn^{++} wirken als Aktivatoren, Co^{++} , Ni^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} und F^{-} als Inhibitoren. Eine glucosearme Diät und Cortison steigern ihre Aktivität.

Die Prostata-Phosphatase.

Die Prostata verfügt über den größten Gehalt an saurer Phosphatase vom Typ 1. Sie hat ein pH-Optimum von 5,3-5,6; nach

LUNDQUIST findet man eine optimale Spaltung von Cholin-Calziumphosphat bei einem pH-Wert von 6,5; sie spaltet auch synthetische Phosphorsäuremonoester, z.B. Phenylphosphat. Von den biologischen Substraten werden 2'- und 3'-Adenosin- und -Uridinphosphat am schnellsten hydrolysiert. Die Prostata-Phosphatase wird durch Alkohol, Aceton und Urethan irreversibel inaktiviert. 0,5%iger Formaldehyd bleibt unwirksam, inaktiviert jedoch andere saure Blutphosphatasen und dient somit als Differenzierungsmittel. Als weitere Inhibitoren der Prostata-Phosphatasen gelten: Fluorid, Na-dodecylsulfat (irrev.), Saccharat, Gluconat, Oxalat, Tartrat (kompetitiv).

Die Milchphosphatase.

Sie gehört zu den alkalischen Phosphatasen und nimmt während der Lactationsperiode zu.

Als Serum phosphatasen schließlich bezeichnet man sämtliche im Blutserum auftretenden Phosphatasen ohne Rücksicht auf ihre Herkunft. Man teilt sie in die Gruppe der sauren (pH-Optimum 4,9-5,0) und alkalischen (pH-Optimum 7-9,5) Phosphatasen ein. Die physiologischerweise im Serum auftretenden Phosphatasen haben nur eine geringe bzw. noch nicht entdeckte funktionelle Bedeutung und sollen im nächsten Kapitel mit angeführt werden.

c) Die klinische Bedeutung der Serumphosphatasen

Die klinische Bedeutung der Serumphosphatasen erwächst aus der Tatsache, daß die im Serum enthaltenen Fermente zum größten Teil nicht aus korpuskulären Blutelementen, sondern aus irgendeinem der oben genannten Organe stammen. Das wird deutlich, wenn bestimmte Erkrankungen dieser Organe eine Erhöhung der sauren bzw. alkalischen Phosphatasen verursachen und damit diagnostische Bedeutung erlangen. Mit verfeinerten chemischen Untersuchungsmethoden gelingt

es, zwar nicht die Fermente selbst, aber ihre Aktivität zu messen (4). Dabei erinnern wir uns daran, daß die Aktivität durch Aktivatoren (z.B. Mg^{++} , Cu^{++} , verschiedene Aminosäuren) und Inhibitoren (z.B. Taurocholat, Bilirubin, Zyanat, Glutathion, Albumin und auch andere Phosphata) entscheidend beeinflußt wird, ohne daß sich die Gesamtmenge an Serumferment ändert. Wir vereinfachen also unsere Vorstellungen, wenn wir annehmen, daß die gemessene Aktivität der Serumfermentkonzentration entspricht.

1.) Die saure Serumphosphatase

Die bisher bekannten Komponenten sind (5):

- a) Thrombocyten-Phosphatase: Sie macht den quantitativ größten Anteil aus. Bevorzugtes Substrat ist α -Glycerophosphat. Sie spaltet auch p-Nitrophenylphosphat. Formaldehyd wirkt inhibitorisch, nicht jedoch L(+)-Tartrat.
- b) Erythrocyten-Phosphatase: Sie wird praktisch nur bei hämolytischem Serum bedeutsam und spaltet α -Naphthylphosphat schlecht. Sie wird durch Formaldehyd gehemmt, nicht jedoch durch L(+)-Tartrat.
- c) Prostata-Phosphatase: Da sie ein Sekretionsprodukt darstellt, gelangt sie normalerweise nicht in die Körperflüssigkeit. Wenn jedoch abnorme anatomische Verhältnisse (Carcinom) entstehen, gelangt sie über Lymph- und Blutbahn ins Serum. Ihr Serumgehalt hängt ab:
 1. von der Menge des Prostata-Gewebes, das nicht mehr an die Ausführungsgänge angeschlossen ist, und
 2. von der Aktivität, mit der die Zellen das Ferment wie auch andere Bestandteile des Prostata-Sekretes bilden (31).Es wird also angenommen, daß das Enzym erst bei an Prostata-Carcinom-Erkrankten im Serum erscheint. Seine selektive Hemmung ist durch L(+)-Tartrat möglich.
- d) Knochen-Phosphatase: Die Erhöhung der sauren Serumphosphatase bei bestimmten Knochenkrankheiten (Met. Mamma-Carcinom, Morbus Paget, Hyperparathyreoidismus) läßt den ossären Ursprung eines solchen Enzyms vermuten (Osteo-

klasten?). Bevorzugte Substrate sind Phenylphosphat und α -Naphthylphosphat.

e) "Gaucher"-Phosphatase (28): Der Ursprung des Fermentes, das bei dieser Lipidose auftritt, ist nicht geklärt (Milz?). Durch L(+)-Tartrat findet keine Hemmung statt. Zweifellos kommt der sauren Prostata-Phosphatase die diagnostisch wichtigste Bedeutung zu, da ihr Erscheinen und ihre Erhöhung in direkter Beziehung zum Prostata-Carcinom mit Skelett-Metastasen steht. Ein primäres Prostata-Carcinom ohne Metastasen bzw. ohne infiltrierendes Wachstum verursacht dagegen keine Erhöhung des Fermentes im Serum (3, 26, 32). Weiterhin läßt sich am Rückgang der Fermentaktivität der therapeutische Erfolg einer Follikelhormonbehandlung ablesen. Demgegenüber ruft eine Stilböstrolbehandlung eine Erhöhung der alkalischen Serumphosphatase hervor. Auch Fieber senkt die Aktivität der sauren Prostata-Phosphatase, wohingegen eine Traumatisierung (Massage) der Drüse eine vorübergehende Erhöhung hervorruft. (27). Schließlich soll auch bei abscedierender Prostatitis (bei Carcinom) und bei eitriger Prostatitis eine Aktivitätserhöhung des Enzyms eintreten (7).

Neben Morbus Gaucher (28) hat man auch bei Morbus Niemann-Pick erhöhte Serumwerte gefunden (6).

Abschließend sei erwähnt, daß der hohe Gehalt von saurer Phosphatase im Ejakulat die Grundlage eines forensischen Nachweises von Spermaflecken mit Hilfe ihrer Aktivitäts-Bestimmung darstellt (9).

2.) Die alkalische Serumphosphatase

Die alkalischen Phosphatasen scheinen Metallproteide zu sein und können nach Dialyse durch zweiwertige Metalle (Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , Co^{++}) aktiviert werden. Dabei stellt Mg^{++} wahrscheinlich den physiologischen Bestandteil des Enzymkomplexes dar (1).

Auch die alkalische Serumphosphatase setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen; der Hauptteil entfällt

auf die Phosphatase aus dem Leber- und Knochengewebe. Nach einer immunochemischen Analyse von SCHLAMOWITZ kommen beim Gesunden (Erwachsener) 40-59% der alkalischen Serum-Phosphatase aus dem Knochen und 30-38% weder aus dem Knochen- noch aus dem Darmgewebe. Bei Patienten mit erhöhter Ferment-Aktivität wegen osteoblastischen Carcinom-Knochenmetastasen, Lebermetastasen oder Choledochus-Obstruktion machte das Enzym aus dem Knochengewebe 75-93% aus. Hier konnten nur 6-22% weder auf einen ossären noch einen intestinalen Ursprung zurückgeführt werden (4). Zwei Theorien bemühen sich, den Aktivitätsanstieg der alkalischen Serumphosphatase zu erklären (4).

Nach der *R e t e n t i o n s t h e o r i e* entstammt fast die gesamte alkalische Serumphosphatase dem Knochengewebe und wird auf dem Umschlagsweg über die Leber durch das Gallengangssystem ausgeschieden. Eine Passagebehinderung des Abflusses führt dann zur Rückstauung ins Serum und einem Anstieg der Serumwerte. Dieser pathologische "Umweg" ist mit Hilfe von Natriumfluorescein als Markierungsmittel dargestellt worden. Für die Theorie spricht die hohe Konzentration von alkalischer Phosphatase im Knochengewebe (osteoblastische Sekretion), der Anstieg der Serumwerte bei Skeletterkrankungen mit überschüssiger Knochenbildung und im Wachstumsalter, schließlich ihre Erniedrigung bei Hypophosphatasie (= Fehlen von alkalischer Phosphatase im Knochen).

Nur wenige Anhänger findet die *h e p a t o g e n e T h e o r i e* (O. BODANSKY). Sie beschränken die erste Theorie nur auf Fälle, bei denen eine Überproduktion bzw. Abflußbehinderung der alkalischen Phosphatase ossären Ursprungs eindeutig festgestellt werden kann. Daneben aber führen sie einen bedeutenden Anteil der alkalischen Serumphosphatase auf einen hepatischen Ursprung zurück. Sie soll bei hepatobiliären Krankheiten in den Leberparenchym- und Gallengangszellen vermehrt gebildet werden. Auch bei Obstruktion der Gallenwege soll ein beachtlicher Teil der

erhöhten Serum-Phosphatase aus den Leberzellen stammen. Aufgrund einer Vielzahl von Untersuchungen ließ sich der Wert der alkalischen Serum-Phosphatasen-Bestimmung zur Erhärtung einer Diagnose nachweisen.

Dabei dominieren die Leberkrankheiten:

Wir übernehmen eine systematische Einteilung (4) und unterscheiden folgende Gruppen:

a) Biliärer, extrahepatischer Verschuß

Von den bösartigen Geschwülsten zeigen das Choledochus-Carcinom in 21% der Fälle eine starke (10 Bodansky-Einheiten, siehe Methoden) und das Karzinom der Gallenblase eine extreme Aktivitätserhöhung der alkalischen Serum-Phosphatase (in 76% d.F. über 20 BE). Bei gutartigen Veränderungen (inkompletter und veränderlicher Verschuß) imponiert nur die Striktur des Choledochus mit eindeutig erhöhten Werten.

GIBBONS fand bei einem großen Prozentsatz von Patienten ohne Ikterus mit Choledochussteinen eine Erhöhung des Phosphatasespiegels (um 16 BE) (8).

b) Biliärer, intrahepatischer Verschuß

Eine Verlegung der Gallenkapillare führt zu Rückstauung, Permeabilitätsstörungen der Gallengangszelle und Durchtritt der alkalischen Phosphatase in die Blutkapillare. Intrahepatische, partielle Obstruktionen, die keinen Ikterus verursachen, lassen sich mit Hilfe des Bromsulphalein-Retentionstests (SHAY und SIPLET) und der Bestimmung des direkten Bilirubins (WATSON) zusätzlich zur Phosphatase-Bestimmung diagnostizieren (8).

Hier stehen raumverdrängende Prozesse (Abszesse, Metastasen) im Vordergrund. Eindeutig erhöhte Werte ergeben sich erst bei vielen (8,5 BE) bis unzähligen (um 12 BE) Knoten. Interessant sind die Untersuchungen von GIBBONS, der bei 38 Patienten mit malignen intraabdominellen Prozessen ohne Ikterus 90%ige Genauigkeit in der Korrelation Phosphataseerhöhung/Lebermetastasen feststellen konnte. (8). Auch bei Patienten mit extraabdominellen malignen

Prozessen sowie bei Carcinom-Operierten ohne Ikterus konnte eine hohe Wahrscheinlichkeit für Lebermetastasen bei erhöhter alkalischer Phosphatase-Aktivität erwiesen werden.

Infiltrative Prozesse (M.Boeck, Tuberkulose, Lymphogranulome, Amyloidose) zeigen nur unregelmäßige Enzym-Aktivitäts-Erhöhung und weisen auf Leberbefall hin. Bei Hepatotoxizität vom cholostatischen Typ führt nur eine Hypersensibilitätstoxizität zu erhöhten Werten (20-40 BE). Folgende Pharmaka sollen zu Schädigungen geführt haben: Arsphenamid, Methyltestosteron, Chlorpromazin, Compazin usw.

Die biliäre Zirrhose ohne pathologisch-anatomische Zeichen für Okklusion oder Infekt zeigt neben einem starken Fermentanstieg erhöhte Serum-Cholesterinwerte und das Bild einer Xanthomatose.

c) Hepatitiden mit Virusbefall

Die Virushepatitis ruft in 66% d.F. erhöhte Werte der alkalischen Serumphosphatase hervor. Der hämolytische Ikterus beeinflusst sie jedoch nicht. Die cholangiolitische Hepatitis bewirkt stets (über 10 BE) und die Mononucleosis infectiosa (29) im überwiegenden Teil der Fälle eine Fermenterhöhung (zwischen 4 und 10 BE). Dann ist natürlich die Leber befallen.

d) Zirrhose und primäres Leberkarzinom

Hier sind nur unregelmäßige und gering erhöhte Werte gefunden worden, die von einer diagnostischen Verwertung abraten lassen.

Wenn ein Verschlußikterus und eine biliäre Lebercirrhose ausgeschlossen sind, kann eine Erhöhung der alkalischen Serumphosphatase über 7,2 BE die Verdachtsdiagnose primäres Leberkarzinom erheblich unterstützen (30).

An zweiter Stelle der für eine Erhöhung der alkalischen Serumphosphatasen verantwortlichen Ursachen stehen die Knochenkrankungen. Auch sie lassen sich in Gruppen zu-

sammenstellen:

a) Osteoblasten-Proliferation (Knochenanbau)

Eine physiologische Erhöhung der alkalischen Phosphatase ist im Wachstumsalter (3-13 BE) und während der Schwangerschaft, besonders im letzten Drittel (8 BE), zu beobachten. Ein pathologischer Anstieg imponiert bei Gigantismus (fehlender Epiphysenschluß), Ostitis deformans Paget (10 - 130 BE!) und bei Osteoporosis circumscripta (Schädel). Hier dient die Ferment-Bestimmung der Erhärtung der röntgenologischen Befunde. Auch eine sarkomatöse Entartung erhöht die alkalische Phosphatase-Aktivität. Cortison-Behandlung führt zu ihrer Abnahme, ein Absetzen zum erneuten Anstieg.

Die Osteodystrophia fibrosa generalisata RECKLINGHAUSEN (nur bei Skelettbefall) bewirkt ebenfalls einen Anstieg der Aktivität, in der Regel jedoch nicht das multiple Myelom und osteolytische Metastasen. Am Fermentanstieg bei Rachitis (Vit.-D-Mangel) von 20 - 200 BE läßt sich die Schwere und das Ausmaß der Erkrankung ablesen; die Behandlung zeigt am Fallen der Werte den therapeutischen Erfolg an. Ebenso weisen Osteomalazie (Milkman Syndrom, Adulte Rachitis) sowie Osteosarkome erhöhte Serumwerte der alkalischen Phosphatase auf.

Metastatische Karzinommetastasen im Knochen ohne Leberbefall lieferten bei Prostata- und Mamma-Carcinom erhöhte Werte.

b) Knochenumbau

Hier wurde nur beim multiplen Myelom eine geringfügige Aktivitätserhöhung angetroffen.

c) Skelettveränderungen mit erniedrigter alkalischer Serumphosphatase werden beim hypophysären und myxödematösen Zwergwuchs sowie bei der Kwashiorkor, einer schweren Ernährungsstörung aus den Tropen, gefunden.(3). Weiterhin werden Achondroplasie, Skorbut (Vit.C-Mangel), Vit.D-Überdosierung und auch der Einfluß radioaktiver Substanzen aufgeführt.

Unter Hypophosphatasie (RATHBUN 1948) versteht man einen genetisch bedingten Mangel an alkalischer Phosphatase in allen Geweben. Da bei dieser Erkrankung Phosphorylaethanolamin im Urin ausgeschieden wird, hat man es als das biologische Substrat der alkalischen Serumphosphatase betrachtet.

HEILMEYER fand bei Verdacht auf abdomineller Lymphogranulomatose sowie bei Knochenherden in 9 von 20 Fällen eine pathologische Erhöhung der alkalischen Phosphatase (25). Schließlich fügen wir noch eine Tabelle bei, die das Zusammenwirken verschiedener Faktoren für die Diagnose einzelner Knochenkrankungen zeigt:

Tab.3: Verhalten der alkalischen Phosphatase bei Knochenkrankungen (n. ABDERHALDEN aus (3))

	Gehalt i. Plasma			Ausscheidung	
	Ca	P	alk. Ph.	Harn	Faeces
Hyperparathyreoidismus primär	↑↑	↓	↑	Ca + P ↑↑	Ca n.
H. sekundär	n. ↓	↑	n., ↑	Ca ↓	
Hypoparath.	↓	↑	n.	Ca + P ↓	Ca n.
Rachitis	n. ↓	↓	n., ↑	Ca ↓	Ca ↑
M. Paget	n.	n.	↑↑	Ca n., ↑	Ca n.
Osteomalazie	n. ↓	n. ↓	↑	Ca ↓ P ↓	Ca ↑
Osteoporose, senil	n.	n.	n.	Ca n., ↓	Ca n.
Hypophosphatasie	n. ↑	n.	↓↓		
Mult. Myelom	n. ↑	n.	n., ↑	Ca + P ↑	
Sarkom	n.	n.	↑	Ca ↑ P n.	
Krebsmet.	n. ↑	n. ↑	meist ↑	Ca ↑	

Wie die Zusammenstellung der Krankheitsbilder mit pathologischer Erhöhung der Serumphosphatasen erkennen läßt, kann ihre Bestimmung sehr oft zur Erhärtung einer klinischen Diagnose herangezogen werden. Sie muß jedoch stets durch andere Untersuchungsbefunde gestützt werden.

II. Bestimmungsmethoden der Serumphosphatasen

a) Allgemeines

Die Methoden zur Bestimmung der sauren bzw. alkalischen Serumphosphatase erfüllen eine zum Grundprinzip erhobene Forderung: Durch spezifische Spaltung einer geeigneten farblosen Verbindung wird ein Reaktionsprodukt frei, das nach Verschiebung des pH auf einen optimalen Wert eine Färbung hervorruft. Ihre Stärke kann im Anschluß kolorimetrisch gemessen werden. Dabei ist die Intensität der Farbe der Aktivität des spaltenden Enzymes direkt proportional. Die Aktivität entspricht aber nur bedingt der Enzymmenge, da sie dem Einfluß verschiedener Faktoren wie Temperatur, Reaktionszeit, pH sowie der Aktivator- bzw. Inhibitorwirkung einiger Ionen ausgesetzt ist. Außerdem ist auch die Substratkonzentration von Bedeutung. Man muß deshalb bestrebt sein, während der ganzen Reaktion eine für das jeweilige Enzym günstige Konstellation der Einflußfaktoren konstant aufrecht zu erhalten.

Bei älteren Verfahren wurde als Temperaturbedingung die "Raumtemperatur" angegeben, eine definitionsgemäß auf 22°C festgesetzte Größe, die jedoch in Laboratorien kaum konstant gehalten werden kann. Deshalb ist man dazu übergegangen, eine mit dem Thermostaten erreichbare Temperatur von 37°C für die Reaktion zu empfehlen. Neben der thermostatisch kontrollierbaren Konstanz ergibt sich noch der Vorteil, daß so die Reaktion bei Körpertemperatur, d.h. unter physiologischen Bedingungen, abläuft und dazu eine kürzere Reaktionszeit (= Inkubationszeit) ermöglicht (meist 30 Minuten).

Der pH-Wert wird durch das der sauren bzw. alkalischen Phosphatase eigene pH-Optimum von rund 5 bzw. 7-9,5 bestimmt. Meist wird er im Anschluß an die Reaktion dergestalt verschoben, daß die durch ein Reaktionsprodukt hervorgerufene Färbung ein Intensitäts-Optimum erreicht und damit zu einer besseren kolorimetrischen Auswertung führt.

Während die alkalische Serumphosphatase über eine weite pH-Linie stabil bleibt, zeigt sich die saure schon gegenüber geringen pH-Schwankungen sehr instabil. Das ist zum Beispiel der Fall, wenn frisches Serum mit einem pH von 7,6 über Nacht aufbewahrt wird. Die H^+ -Konzentration sinkt dann entsprechend dem Verlust an CO_2 auf einen pH-Wert von 8,5. Um diese Wirkung weitgehend zu unterbinden, wurde vorgeschlagen, das Serum in kleinen mit Stopfen verschlossenen Gläsern aufzubewahren und es weiterhin noch mit Dinatriumcitrat (10 mg/ml) zu versetzen (23). Die erste Maßnahme reduziert die nächtliche pH-Zunahme, die zweite erniedrigt den pH auf 6,5. Bei dieser H^+ -Konzentration ist das Enzym recht beständig. Statt Dinatriumcitrat wird von anderer Seite $NaHSO_4$ als Stabilisator empfohlen.(15). RAABE (33) hat zur Reaktivierung der sauren Serumphosphatase einen Zusatz von Natriumaskorbinat vorgeschlagen. Die Genauigkeit der angeschlossenen Phosphatase-Bestimmung wird aber durch andere Untersuchungen in Frage gestellt (15,34,35). Die Substratkonzentration ist in den Puffer/Substratlösungen der einzelnen Verfahren so ausgewählt, daß sie einen bestmöglichen Reaktionsverlauf gewährleistet.

Die Aktivator- bzw. Inhibitor-Wirkung spielt bei der alkalischen Serumphosphatase nur eine untergeordnete Bedeutung. Für die beiden Komponenten (hepatogener und ossärer Ursprung) scheint vor allem die Anwesenheit von Mg^{++} wichtig zu sein; dieses Metallion soll den physiologischen Aktivator darstellen.

Von besonderer Bedeutung ist die Aktivator/Inhibitorwirkung jedoch für die saure Serumphosphatase. Durch den Inhibitor Formaldehyd wird es möglich, die Thrombocyten- und Erythrocyten-Phosphatase selektiv zu hemmen und die wichtigste Komponente, die Prostata-Phosphatase, praktisch allein zu bestimmen. Diese wiederum wird durch L(+)-Tartrat gehemmt, während die anderen Komponenten nicht beeinflußt werden. Nur die bei bestimmten Krankheiten auftretenden Knochen- und "Gaucher"-Phosphatasen verhalten sich

gegenüber den beiden Inhibitoren indifferent.

Die enzymbedingte Substratspezifität der Phosphatasen fällt bei der sauren Serumphosphatase insofern stärker ins Gewicht, als ihre einzelnen Anteile verschiedene Substrate selektiv bevorzugen. Der für diagnostische Zwecke wichtigste Anteil, die Prostata-Phosphatase, soll nach den Untersuchungen von BABSON und Mitarbeitern vom Substrat α -Naphthylphosphat am besten erfasst werden (10). Und zwar übertrifft es das Substrat β -Glycerophosphat um das Doppelte, dagegen β -Naphthylphosphat, p-Nitrophenylphosphat, Phenolphthaleinphosphat und Phenylphosphat um das 40- bis 100-fache.

Von der Thrombocyten-Phosphatase wird α -Glycerophosphat bevorzugt, aber auch p-Nitrophenylphosphat gespalten (5). Die Knochenphosphatase zieht Phenylphosphat und α -Naphthylphosphat vor (5).

b) Beschreibung von Methoden

Die wichtigsten Methoden seien kurz aufgestellt. Wir nehmen die Einteilung nach der Substratverwendung vor (11).

1.) Na- β -Glycerophosphat (0,5 ml Serum/Ansatz)

Methode: LANGEMANN 1949 (Modifikation BODANSKY) (36)

Definition der Enzymaktivität: 1 E entspricht der Enzymmenge in 100 ml Serum, die in 60' (saure Phosphatase: 24 Std.) 1 mg P_0 abspaltet.

alkalische Phosphatase: Veronal-Na-Puffer pH 8,7; 60' I.Z. (Inkubations-Zeit), 38°C I.T. (Ink.-Temperatur); N.W. (Normalwerte): 2-5 BE (Bodansky-Einheiten).

saure Phosphatase: Acetatpuffer pH 6,0; 4 Std. I.Z., 38°C I.T.; N.W. 4-7 E

2.) Dinatriumphenylphosphat (0,2 ml Serum/Ansatz)

Methode KIRBERGER und MARTINI (Mod. KING-ARMSTRONG)

Definition der Enzymaktivität: 1 E entspricht der Enzymmenge in 100 ml Serum, die in 15' (60' bei der sauren Phosphatase) 1 mg Phenol freisetzt.

alkalische Ph.: Veronal-Na-Puffer pH 9,0; 15' I.Z.,

37°C I.T.; N.W. 5-10 KAE (King-Armstrong-Einheiten)
saure Ph.: Zitratpuffer pH 4,9; 60' I.Z., 37°C I.T.;
N.W. 1-3 GE (Gutman-Einheiten)

3.) Phenolphthaleinphosphat (0,5 ml Serum/Ansatz)

Methode: LINHARDT u. WALTER (1952) (Mod. HUGGINS/TALALAY)

Definition der Enzymaktivität: 1 E entspricht der Enzymmenge in 100 ml Serum, die 0,1 mg Phenolphthalein in 60' bei 37°C abspaltet.

alkalische Ph.: Veronalnatriumpuffer pH 9,7; 2 Std. I.Z.

37°C I.T.; N.W. 3-15 HE (Huggins-Talalay-Einheiten)

saure Ph.: Acetatpuffer pH 5,4; 2 Std. I.Z., 37°C I.T.

N.W. 3-10 HE

4.) p-Nitrophenylphosphat (0,2 ml Serum/Ansatz)

Prinzip: Nach 30' I.Z. wird die Phosphatase durch NaOH total gehemmt, und aus dem freigesetzten p-Nitrophenol entsteht das gelbe Anion. Die Phosphatase-Aktivität ist der Menge des pro Zeiteinheit freigesetzten p-Nitrophenols direkt proportional (12).

Definition der Enzymaktivität: 1 E entspricht der Enzymmenge in 1 Liter Serum, die in 1 Std. bei 37°C 1 mMol (=140 mg) Paranitrophenol freisetzt.

alkalische Ph.: Methode BESSEY, LOWRY u. BROCK (1946) (13); Glykokollpuffer pH 10,5; 30' I.Z., 37°C I.T.

N.W. 0,8-2,9 mMol-E

saure Ph.: Methode: ANDERSCH (1957) (7); Zitratpuffer pH 4,8; 30' I.Z., 37°C I.T.;

N.W. Männer: 0,03 - 0,63 mMolE

Frauen: 0,01 - 0,56 mMolE

Dieses Substrat wird vom Serumbilirubin interferierend beeinflusst, so daß keine genaue Phosphatase-Aktivität zu bestimmen ist. Zur Korrektur des Fehlers bieten sich zwei Möglichkeiten an:

1. Bei einer gesetzmäßigen Abhängigkeit sowohl der p-Nitrophenol- als auch der Bilirubin-Absorption (LAMBERT-BEERSches Gesetz) wird von der optischen Dichte

der Analyse die Extinktion der mit einem Tropfen HCl versehenen Analysenlösung abgezogen. Das Ergebnis wird dann in Phosphatase-Einheiten umgewandelt (BESSEY u.a.).

2. Besteht kein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen beiden Absorptionen, werden beide Extinktionswerte zunächst in Phosphatase-Einheiten umgewandelt und dann erst subtrahiert.

Die Bilirubin-Absorption ist in einer sauren Kontrolle weniger ausgesprochen als in alkalischer.

Außerdem fand BABSON, daß genaue Phosphatase-Aktivitätsmessungen bei Verwendung des Substrates p-Nitrophenyl-Phosphat nicht mit einem Filter-Colorimeter zu erlangen sind, sondern ein Spektralphotometer erfordern (24).

c) Korrelation zwischen den verschiedenen Einheiten

Neuerdings ist man bemüht, als vergleichende Einheit die internationale Aktivitätseinheit (1 IU) einzuführen: 1 IU entspricht der Enzymmenge in 1000 ml Serum, die in 1 Minute (1') 1 μ Mol Substrat umsetzt.

Die Äquivalente zu den alten Einheiten gehen aus folgender Aufstellung hervor (14):

Methoden	1 alte Einheit	Äquivalent Mol/min/1000 ml (37° C)
alkalische Ph.:		
King-Armstrong 1937, 1942	1mg Phenol/15'/100ml	7,10
Bodansky 1933	1mg anorg.P/Std./100ml	5,35
Bessey-Lowry- Brock 1946	1mMol p-Nitrophenol/ Std./1000ml	16,70
saure Ph.:		
King-Armstrong 1945	1mg Phenol/Std./100ml	1,80
Bodansky 1933	1mg anorg.P/Std./100ml	5,35
Bessey-Lowry- Brock 1946	1mMol p-Nitrophenol/ Std./1000ml	16,70

Die internationale Aktivitätseinheit hat sich aber erst wenig durchsetzen können, so daß man heute oft vor die Aufgabe gestellt wird, die Einheiten verschiedener Methoden direkt miteinander zu vergleichen. Hierzu ermittelten SÜDHOF u. a. an Hand zahlreicher Untersuchungen Umrechnungsfaktoren (11).

Umrechnungsfaktoren für den Vergleich von Aktivitäten der alkalischen Phosphatase nach den Methoden von

BESSEY (mMole)

KING-ARMSTRONG (KAE)

BODANSKY (BE)

HUGGINS (HE)

$n \text{ mMole} = 4,2n - 2,4 \text{ KAE}$	$n \text{ KAE} = 0,24n + 0,595 \text{ mMole}$
$n \text{ mMole} = 2n - 0,8 \text{ BE}$	$n \text{ BE} = 0,5n + 0,4 \text{ mMole}$
$n \text{ mMole} = 3,4n \text{ HE}$	$n \text{ HE} = 0,29n \text{ mMole}$
$n \text{ KAE} = 0,48n + 0,4 \text{ BE}$	$n \text{ BE} = 2,1n - 0,8 \text{ KAE}$
$n \text{ KAE} = 0,814n + 1,99 \text{ HE}$	$n \text{ HE} = 1,23n - 2,45 \text{ KAE}$
$n \text{ BE} = 1,71n + 1,25 \text{ HE}$	$n \text{ HE} = 0,584n - 0,73 \text{ BE}$

Normalbereiche: $0,9 - 4,1 \text{ mMole}$

$1,0 - 7,1 \text{ BE}$

$3,0 - 13,7 \text{ HE}$

$1,5 - 14,5 \text{ KAE}$

Bei der sauren Phosphatase hat der zitierte Autor von der Aufstellung von Vergleichsfaktoren abgesehen und sich nur mit Vergleichsdiagrammen begnügt. Lediglich für die Umrechnung der Methode von ANDERSCH (mMole) in HE der Methode von LINHARDT u. WALTER (Mod. HUGGINS-TALALAY) gibt er die genaue Umrechnung $1 \text{ mMole} \approx 10 \text{ HE}$ an. Er hat vermutlich deshalb auf die Angabe von Umrechnungsfaktoren verzichtet, weil die Vergleichsbedingungen für die verschiedenen Methoden bei der sauren Phosphatase durchaus nicht so günstig liegen wie bei dem alkalischen Enzym. Obgleich diese Ansicht vom Autor ausdrücklich geleugnet wird, kann er nicht umhin festzustellen, daß bei der sauren Phosphatase im Vergleich zur alkalischen in den Diagrammen eine

größere Streuung ins Auge fällt und daß "eine Umrechnung (in die verschiedenen Einheiten) nicht mit der gleichen Zuverlässigkeit möglich (ist) wie bei der alkalischen Phosphatase" (11).

d) Im Experiment verwandte Methoden

1. Vollquantitative Methoden

Zur Testung der halbquantitativen "Phosphatabs"-Schnellmethode benutzten wir als Bezugsmethoden für die saure und alkalische Serumphosphatasen-Bestimmung die "Testcombination" Saure bzw. Alkalische Phosphatase der Fa. C.F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim, und die Kombination Phosphatabs-Acid bzw. -Alkaline Quantitative der Warner-Chilcott Morris Plains N.J. (General Diagnostics Division), bezogen von der Fa. Gödecke & Co, Memmingen.

Methoden für die saure Phosphatasen-Bestimmung:

Testcombination Saure Phosphatase (Fa. Boehringer)

Verwendung des Substrates p-Nitrophenylphosphat, Methode nach ANDERSCH (7).

Prinzip: Die saure Serumphosphatase spaltet das farblose p-Nitrophenylphosphat in Phosphorsäure und p-Nitrophenol. Das im sauren Milieu farblose Spaltprodukt p-Nitrophenol wird im alkalischen Bereich kolorimetrisch bestimmbar (gelbes Anion). Die Menge des entstehenden p-Nitrophenols ist der Enzymaktivität direkt proportional.

Apparate: Zur Extinktionsmessung wird ein genau arbeitendes Photometer (z.B. Eppendorf) mit quadratischen Küvetten von 1 cm Schichtdicke benötigt. Filter: 400 $m\mu$

Ferner ist ein Wasserbad mit thermostatischer Regulierung auf 37°C erforderlich.

Geräte:

1 Vollpipette 4,0 ml

1 Vollpipette 1,0 ml

Für das Abmessen der Serummengen empfehlen sich Stangenpipetten zu 0,2 ml mit ausgezogener Spitze, die nicht bis zum Ende graduert sind (Vorteilhaft zu beziehen von Fa. Ludwig Hormuth, Heidelberg, Bluntschlistr.4)

Reagenzien:

1. Citronensäure p.a.
2. Na-Citrat p.a.
3. p-Nitrophenylphosphat-Na

In einer Testpackung sind enthalten:

I. Puffer: 0,05 M Citratpuffer pH = 4,8.

Zum Gebrauch wird die in einem Fläschchen befindliche Lösung mit bidest. Wasser ad 100 ml verdünnt.

II. Substrat: ca. 10 Tabl. mit je 15 mg p-Nitrophenylphosphat-Na.

Ferner werden hergestellt:

III. Puffer/Substrat: 0,05 M Citratpuffer pH 4,8;

$5,5 \times 10^{-2}$ M p-Nitrophenylphosphat-Na. Für je 5 Bestimmungen löst man 1 Tablette aus II in 10 ml Puffer auf.

IV. Natronlauge: ca. 0,05 N NaOH. Hierzu wird 1 g Natriumhydroxyd (z.B. Merck Nr.6498) mit dest. Wasser ad 500 ml gelöst.

Haltbarkeit der Lösungen: Puffer (I) ist in verschlossener Flasche bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar.

Ebenfalls die Substrat-Tabletten.

Puffer/Substrat-Lösung (III) ist bei Aufbewahrung im Kühlschrank (0 bis +6 °C) bis zu einer Woche haltbar. Die Natronlauge (IV) ist, in einer verschlossenen Flasche (Gummi- oder Kunststoffen) aufbewahrt, unbegrenzt haltbar.

Praktischer Arbeitsgang

Es empfiehlt sich, nur frisches Serum zu verwenden. Im Falle einer kürzeren Aufbewahrung oder zu Versandzwecken läßt sich die Phosphatase-Aktivität unter Zusatz von einigen Kristallen NaHSO_4 stabilisieren (15). Hämolytische Seren sind nicht brauchbar (5). Bei leicht hämolytischem Serum soll man zu Probe und Leerwert noch je 0,02 ml Formaldehyd-Lösung (20%ige Lösung, mit NaOH neutralisiert) hinzugeben (16). Dadurch wird die saure Erythrocyten-Phosphatase weitgehend gehemmt.

Ansatz

Neben jeder Probe läuft ein Leerwert. In beide Reagenzgläser werden nacheinander pipettiert:

Probe	Leerwert
1,00 ml Puffer/Substrat	1,00 ml Puffer/Substrat
0,20 ml Serum	-----

Durch leichtes Umschwenken mischen und 30 Minuten in einem

Wasserbad von 37°C inkubieren. Daraufhin

Probe	Leerwert
4,00 ml 0,05n NaOH	4,00 ml 0,05 n NaOH
-----	0,20 ml Serum

zugeben und mischen.

Anschließend wird die Farbdifferenz (Extinktions-Differenz, ΔE) zwischen Probe und Leerwert in 10 mm-Küvetten bei 405 $m\mu$ (oder einer Wellenlänge zwischen 390 und 420 $m\mu$) ermittelt.

Berechnung der Aktivität

Es gilt eine Beziehung zwischen der gemessenen Extinktionsdifferenz und der Phosphatase-Aktivität herzustellen.

Die Extinktion ist von mehreren Faktoren abhängig, die im Lambert-Beerschen Gesetz zusammengefasst sind (17). Zwischen der Durchlässigkeit und der Konzentration einer Lösung besteht ein exponentielles Verhältnis:

$$I/I_0 = e^{-c \cdot d \cdot \beta} \quad \text{oder} \quad I/I_0 = 10^{-c \cdot d \cdot \epsilon}$$

I = durchtretender Lichtstrom

I_0 = eingestrahelter Lichtstrom

β = molarer ϵ = dekadischer Extinktionskoeffizient (dek. in cm^2/Mol); e = natürlicher Logarithmus

c = Konzentration in Mol/l ($1 = \text{ml } 10^3$), d = Schichtdicke in cm .

Durch Logarithmierung erhält man:

$$-\log I/I_0 = E = c \cdot d \cdot \epsilon$$

Die Extinktion E entspricht dem negativen dekadischen Logarithmus der Durchlässigkeit. Unter der Berücksichtigung $\text{ml} = \text{cm}^3$ ergibt sich, daß sie keine Dimension besitzt:

$$E = c \cdot d \cdot \epsilon \quad \frac{\text{Mol}}{\text{cm}^3} \cdot \frac{\text{cm}}{\text{Mol}} \cdot \frac{\text{cm}^2}{\text{cm}^3} \cdot \frac{\text{cm}^3}{\text{Mol}}$$

Setzt man in die Gleichung die für unsere Versuchsanordnung gegebenen Werte ein, die der Einheitsdefinition der Phosphatase-Aktivität entsprechen, so erhält man den Umrechnungsfaktor von Extinktion auf Phosphatase-Einheit.

Definition der Aktivitäts-Einheit: 1 Phosphatase-Einheit entspricht der in 1 Liter Serum enthaltenen Enzymmenge, die in 1 Std. bei 37°C 1 mMol = 140 mg p-Nitrophenol freisetzt.

Wenn in 1l Serum 1 mMol enthalten ist, dann befindet sich in 0,2 ml Serum nur 0,2 μ Mol. Da die Menge des entstehenden p-Nitrophenols der Enzymaktivität direkt proportional ist, wird bei einer Inkubationszeit von 1/2 Std. nur $1/2 \cdot 0,2 \mu\text{Mol} = 0,1 \mu\text{Mol}$ (= 14 γ p-Nitrophenol) gebildet. Es ist also 0,1 μ Mol in 5,2 ml Testvolumen enthalten. Die Konzentration beträgt demnach $10^{-7}/5,2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l.

Die Schichtdicke der Meßlösung beträgt 1 cm.

Der molare Extinktionskoeffizient wird von der Fa. Boehringer bei 400 $m\mu$ (Wellenlänge λ) und einem pH von 11,5 mit $18,8 \times 10^3$ cm²/Mol angegeben. Setzt man die Werte in die Gleichung ein, erhält man:

$$\Delta E = \frac{10^{-7} \times 1 \times 18,8 \times 10^3}{5,2 \times 10^{-3}} = \underline{0,362}$$

1 saure Phosphatase-Einheit nach ANDERSCH entspricht also einer Extinktionsdifferenz von 0,362. Bei einer Wellenlänge von 400 $m\mu$ erhält man Phosphatase-Einheiten (PhE) durch Division der gemessenen Extinktionsdifferenz durch 0,362:

$$\frac{\Delta E_{400}}{0,362} = \Delta E \times 2,76 = \text{mMolE (saure Ph.)}$$

Weiterhin ergibt sich:

$$\Delta E_{405} \times 2,81 = \text{mMolE (saure Ph.)}$$

$$\Delta E_{420} \times 3,58 = \text{mMolE (saure Ph.)}$$

Wir führten unsere Messungen mit dem Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 405 $m\mu$ durch. Zur Vereinfachung der Umrechnung kann man ein Diagramm herstellen. Trägt man auf die Abszisse die Extinktions- und auf die Ordinate die mMol-Einheiten auf, dann liegen sämtliche Bezugspunkte Ext-PhE

auf der Geraden mit der Funktionsgleichung $y = 2,81 \cdot x$.

Normalwerte (Serum) für die saure Phosphatase:

Kinder u. Jugendliche bis zum 15. Lebensjahr:
 $0,87 \pm 0,2 \text{ mMole (SÜDHOF)}$

Erwachsene: $0,49 \pm 0,15 \text{ mMole (SÜDHOF)}$

Im ersten Teil unserer Versuche benutzten wir als zweite vollquantitative Methode eine von WARNER-CHILCOTT gegebene Versuchsanleitung unter Verwendung von "Phosphatabs"-Reagenzien (Phosphatabs Acid). Es handelt sich um das Verfahren von BABSON und READ mit dem Substrat α -Naphthylphosphat.

Prinzip: Die saure Phosphatase spaltet das Substrat α -Naphthylphosphat. Das freigesetzte α -Naphthol verbindet sich mit bis-diazotiertem o-Dianisidin zu einem Azofarbstoff. Seine Farbintensität stellt ein Maß für die Enzymaktivität dar.

Apparate: Zur Extinktionsmessung wird ein Photometer mit quadratischen Küvetten von 1cm Schichtdicke benötigt. Filter: 520-550m μ). Wasserbad, thermostatisch auf 37°C regulierbar.

Geräte:

Graduierte 5ml-Teströhrchen

1 Vollpipette 0,5 ml

Stangenpipetten zu 0,2 ml mit ausgezogener Spitze sind zu empfehlen (siehe vorher).

Chemikalien:

100 mg α -Naphthol p.a.

10 ml 95%iger Alkohol

0,85%ige NaCl

Reagenzien: In einer Packung "Phosphatabs-Acid" sind enthalten:

Substrat-Tabletten (α -Naphthylphosphat)

Farbentwickler-Tabletten (bis-diazotiertes o-Dianisidin).

Herstellung der Standardlösung:

1.) Standardlösung: 94,5 mg α -Naphthol werden in 10 ml 95%igem Alkohol aufgelöst, dann wird Aqua dest. bis zur 100 ml-Marke aufgefüllt. Diese Stammlösung wird zum Versuch 1 : 10 mit normalem Serum verdünnt. Die Standardlösung enthält also 0,1 ml Stammlösung in 0,9 ml Serum.

- 2.) Zwei auf 5 ml geeichte Teströhrchen werden mit der Aufschrift "Leerprobe" bzw. "Standard" versehen und in jedes Röhrchen jeweils 0,5 ml destilliertes Wasser pipettiert.
- 3.) In das "Standard"-Röhrchen wird eine Substrattablette Phosphatabs Acid gegeben; kräftig schütteln.
- 4.) 0,2 ml der Standardlösung werden in beide Röhrchen pipettiert.
- 5.) Eine Farbentwicklertablette wird in das "Standard"-Röhrchen gegeben. Uhr in Gang setzen und Tablette mit dem Glaastäbchen zerdrücken. Auf 5 ml mit 0,85%iger NaCl verdünnen. 3 Minuten inkubieren.
- 6.) Das "Leerprobe"-Röhrchen wird mit 0,85%iger NaCl bis zur Marke aufgefüllt.
- 7.) Die Leerprobe wird bei einer Wellenlänge von $530m\mu$ auf 100% Transmission bzw. o.D. = 0 eingestellt (Ablesung zwischen 520 und $550m\mu$ möglich).
- 8.) Nach 3 Minuten wird die Standardprobe abgelesen.
- 9.) Das Ergebnis wird nach folgender Formel errechnet:
$$\frac{\text{o.D. des Leerwertes}}{\text{o.D. des Standards}} \times 20 - 1,1 = \text{mg } \alpha\text{-Naphthol/Std.}$$

= Babson-Read-Einheiten der sauren Phosphatase.

Arbeitsweise

- 1.) Zwei auf 5 ml geeichte Teströhrchen werden mit der Aufschrift "Leerwert" und "Test" versehen und in jedes Röhrchen jeweils 0,5 ml destilliertes Wasser pipettiert.
- 2.) In das "Test"-Röhrchen wird eine Substrattablette Phosphatabs Acid gegeben und unter Schütteln gelöst.
- 3.) Das "Test"-Röhrchen wird in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Der Leerwert braucht nicht inkubiert zu werden.
- 4.) In beide Röhrchen werden jeweils genau 0,2 ml Serum pipettiert. Die Spitze der Pipette direkt über die Flüssigkeit halten und ausblasen.
- 5.) Nach genau 30 Minuten Inkubationszeit bei 37°C wird das "Test"-Röhrchen aus dem Wasserbad genommen und in ein Becherglas mit Wasser von etwa $15\text{--}20^{\circ}\text{C}$ gestellt.

Sofort die Farentwicklertablette zufügen und zur besseren Lösung mit einem Glasstäbchen zerdrücken. Bis zur 5ml-Marke mit 0,85%iger NaCl auffüllen. 3 Minuten inkubieren.

6.) Die Leerprobe auf 5 ml mit 0,85%iger NaCl verdünnen und im Photometer auf 100% Transmission bzw. o.B. = 0 bei 530^{mμ} einstellen (520-550).

7.) Genau 3 Minuten nach Zugabe der Farentwicklertablette wird das "Test"-Röhrchen abgelesen.

Berechnung:

Die Resultate müssen in optischer Dichte abgelesen werden, oder sie sind in optische Dichte umzuwandeln. Die Konzentration der sauren Phosphatase wird dann nach folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{o.D. des Patientenserums}}{\text{o.D. des Standards}} \times 20 - 1,1 = \text{mg } \alpha\text{-Naphthol/Std.}$$

= Babson-Read-Einheiten der sauren Phosphatase.

Zur Angabe in Bodansky-Einheiten (BE) werden die Resultate entweder durch 5,6 dividiert oder mit 0,18 multipliziert.

Zur Angabe in King-Armstrong-Einheiten (KAE) werden die Babson-Read-Einheiten durch 2 dividiert und zum Resultat dann 2 addiert.

Im zweiten Teil unserer Versuche benutzten wir anstelle der letzten Methode eine neuerdings von der amerikanischen Fa. Warner-Chilcott herausgebrachte Kombination Phosphatabs Acid Quantitative. Methode und Prinzip stammen mit der eben beschriebenen überein.

Apparate: siehe vorherige Methode.

Geräte:

Es können normale Reagenzgläser verwandt werden.

1 Vollpipette zu 5, 1, 0,5 ml

Stangenpipetten zu 0,2 ml mit ausgezogener Spitze.

Reagenzien: Die Kombinationspackung enthält:

Substrattabletten (α -Naphthylphosphat)

Farentwicklertabletten (dis-diazotiertes o-Dianisidin)

2 Fläschchen α -Naphthol-Standard-im-Serum (a)

Außerdem noch ein Fläschchen Versatol (b), das zusätzlich bezogen werden muß.

Standard-Herstellungsverfahren

1.) Folgende Standard-Konzentrationen lassen sich herstellen:

St.1 (18,9 Einheiten): Der Inhalt von Fläschchen a wird in genau 1,0 ml dest. Wasser aufgelöst.

St.2 (0 Einheiten): Der Inhalt von Fläschchen b wird in genau 5,0 ml dest. Wasser aufgelöst.

St.3 (9,5 Einheiten): Genau 0,4 ml St.1 werden mit 0,4 ml St.2 gemischt.

St.4 (14,2 Einheiten): Genau 0,2 ml St.1 werden mit 0,2 ml St.3 gemischt.

St.5 (4,7 Einheiten): Genau 0,2 ml St.3 werden mit 0,2 ml St.2 gemischt.

2.) Genau 0,2 ml einer jeden Konzentrationslösung werden in je ein beschriftetes Röhrchen pipettiert und diese in ein Glas Wasser von 15-20°C gestellt.

3.) Photometer einschalten und 530~~mp~~ 520-550)-Filter einlegen.

4.) Jede Konzentration wird folgendermaßen abgelesen:

a. Genau 0,5 ml dest. Wasser wird in jedes Röhrchen pipettiert. Eine Substrattablette wird hinzugefügt, mit einem Glasstäbchen zerdrückt und aufgelöst. Das Stäbchen bleibt im Röhrchen.

b. Eine Farbentwicklertablette wird zugegeben. Uhr in Gang setzen und sofort die Tablette mit dem Glasstab zerdrücken und zur Auflösung bringen. Danach genau 5 ml 0,85%ige NaCl nachfüllen, mischen und die Lösung in eine Meßküvette umfüllen. Die Küvette wird in ein kaltes Wasserbad gestellt.

c. Nach genau 3 Minuten Farbentwicklung wird die optische Dichte (oder %-Transmission) gegen Wasser abgelesen und notiert.

5.) Jedes Meßergebnis wird auf Millimeter-Papier in ein Koordinatensystem (Abszisse: Ext.-E; Ordinate: Babson-Read-Einheiten) eingetragen. Die Punkte müssen auf einer Geraden liegen. Wenn das nicht der Fall ist, wird man nach

Fehlern in Verfahren oder Technik suchen müssen. Die Gerade dient als Richtlinie für alle zu ermittelnden Phosphatase-Werte.

Testverfahren

- 1.) Photometer auf eine Wellenlänge von $530\text{m}\mu$ (520-550) einstellen.
- 2.) In ein Teströhrchen wird 0,5 ml dest. Wasser pipetiert. Eine Substrattablette hinzufügen und mit einem Glasstäbchen zerdrücken. Der Glasstab bleibt im Röhrchen. Es wird in einem Wasserbad von 37°C vorgewärmt.
- 3.) Genau 0,2 ml Patientenserum zugeben. Dabei soll man die Pipettenspitze gerade über dem Lösungsspiegel halten um zu verhindern, daß Serum an der Röhrchenwand oder am Glasstab verloren geht.
- 4.) Nach genau 30 Minuten Inkubationszeit Röhrchen aus dem Wasserbad herausnehmen und in ein Glas Wasser von $15-20^{\circ}\text{C}$ stellen. Eine Farbentwicklertablette hinzufügen, die Uhr in Gang setzen und die Tablette sofort mit dem Glasstab zerdrücken und auflösen lassen. Danach werden 5 ml 0,85%iger NaCl zugegeben, die Lösung gemischt und in eine Meßküvette gefüllt. Die Küvette wird in ein Becherglas mit kaltem Wasser gestellt.
- 5.) Nach 3 Minuten Farbentwicklung wird die Extinktion gegen Wasser abgelesen.
- 6.) Unter Benutzung der Standardkurve läßt sich die Aktivität in Babson-Read-Einheiten angeben.

Umrechnung:

Zur Umrechnung in Bodansky-Einheiten (BE) werden die Resultate (Babson-Read-Einheiten) mit 0,18 multipliziert. Zur Umrechnung in King-Armstrong-Einheiten (KAE) werden die Ergebnisse durch 2 dividiert und dann 2 hinzu addiert.

In unseren Versuchen haben wir uns für die Angabe in Bodansky-Einheiten entschieden. Zur Erleichterung der Umrechnung läßt sich die Babson-Read-Einheit "eliminieren",

wenn man die Funktionsgleichung der Standardgeraden (Babson-Read-E) direkt mit 0,18 multipliziert: $y = 0,18 \cdot mx$.

Anmerkungen:

Zu 2.): Bei Gruppenbestimmungen kann man vorher eine Substratlösung ansetzen, indem man etwas mehr als die genau benötigte Substratmenge in dest. Wasser löst. Die Substratlösung muß dann in einer braunen Flasche in einem Eisbad aufbewahrt werden und ist für jede Bestimmungsreihe zu erneuern.

Hohe Bilirubinspiegel, trübe und lipämische Seren können hohe Werte vortäuschen. Für den seltenen Fall, daß die saure Phosphatase eines stark ikterischen oder lipämischen Serums bestimmt werden muß, sollten Leerwerte vom Patientenserum und Versatol ohne Inkubationszeit mitlaufen (aber mit 3 Minuten Entwicklungszeit). Die "Aktivitäts"-Differenz zwischen dem Versatol- und Patientenserum-Leerwert muß dann von der ermittelten Aktivität des inkubierten Patientenserums abgezogen werden.

Neben der exakt zu ermittelnden Relation zwischen Extinktion und Phosphatase-Aktivität an Hand einer Geraden birgt die Methode noch den Vorteil, daß man unter normalen Bedingungen auf einen mitlaufenden Leerwert verzichten kann.

Methoden für die alkalische Phosphatasen-Bestimmung:

Testcombination Alkalische Phosphatase (Fa. Boehringer)

Die Methode geht auf die Angaben von BESSEY, LOWRY und BROCK (13) zurück, das Substrat ist p-Nitrophenylphosphat.

Prinzip: Die alkalische Phosphatase spaltet p-Nitrophenylphosphat in Phosphorsäure und p-Nitrophenol. Substrat wie Spaltprodukt p-Nitrophenol haben ihr Absorptionsmaximum bei 310 bzw. 318 $m\mu$. Das Substrat ist im sauren und alkalischen Bereich farblos; p-Nitrophenol zeigt nach Alkalisierung im stark alkalischen Bereich eine Gelbfärbung, die einer bathochromen Verschiebung seines Absorptionsmaximums um ca. 80 $m\mu$ entspricht. Es besteht eine direkte

Proportionalität zwischen der bei 400 μ gemessenen Farbintensität und der Enzymaktivität.

Apparate:

Zur Extinktionsmessung wird ein Filterphotometer mit einem Filter um 400 μ (z.B. Eppendorf) und quadratischen Küvetten von 1 cm Schichtdicke benötigt. Ferner ist zur Inkubation ein Wasserbad mit thermostatischer Regulierung auf 37°C erforderlich.

Geräte:

Reagenzgläser

1 Vollpipette 10,0 ml

1 Vollpipette 1,0 ml

Stangenpipetten zu 0,2 ml mit ausgezogener Spitze zum Abmessen der Serummengen (siehe vorher).

Reagenzien: In der Testpackung sind enthalten:

Glycin und p-Nitrophenylphosphat-Na.

Herstellung der Lösungen

I. Puffer: 0,05 M Glycinpuffer pH = 10,5; 5×10^{-4} M MgCl_2 . Die Lösung befindet sich in einer Flasche und wird mit bidest. Wasser ad 200 ml verdünnt.

II. Substrat: ca. 20 Tabletten mit je 15 mg p-Nitrophenylphosphat-Na.

III. Puffer/Substrat: 0,05 M Glycinpuffer pH 10,5; 5×10^{-4} M MgCl_2 ; $5,5 \times 10^{-2}$ M Nitrophenylphosphat-Na

Für je 5 Bestimmungen wird 1 Tablette "Substrat" in 10 ml "Puffer" aufgelöst.

IV. Natronlauge: ca. 0,02 N NaOH

0,40 g Natriumhydroxyd (z.B. Merck Nr. 6498) mit dest. Wasser ad 500 ml lösen.

Haltbarkeit der Lösungen

Puffer: in verschlossener Flasche auch bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar (Bakterienwachstum vermeiden!) Der Puffer kann mit der Zeit Kohlendioxyd aus der Luft aufnehmen; deshalb sollte man den pH-Wert nach einiger Zeit überprüfen. Gegebenenfalls ist er mit einigen Tropfen konz. NaOH nachzustellen.

Puffer/Substrat: kühl aufbewahren (0 bis +6°C). Die Lösung kann bis zu einer Woche verwendet werden.

Natronlauge: sie ist in einer mit einem Gummi- oder Kunststoffen verschlossenen Flasche unbegrenzt haltbar.

Praktischer Arbeitsgang

Es empfiehlt sich, nur frisches Serum zu verwenden. Dennoch können Seren ohne auffällige Aktivitätseinbuße mehrere Monate eingefroren aufbewahrt bleiben, da die alkalische Phosphatase ziemlich stabil ist (18). Hämolytische Seren

sollan nicht verwandt werden, da die Erythrocyten reich an alkalischer Phosphatase sind (18). Bei Meßergebnissen über 6 Einheiten 0,1 ml Serum mit 0,9 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnen und die Bestimmung wiederholen.

Ansatz

Neben einer Probe läuft ein Leerwert. In beide Reagenzgläser werden nacheinander pipettiert:

Probe	Leerwert
1,00 ml Puffer/Substrat	1,00 ml Puffer/Substrat
0,10 ml Serum	-----

Durch leichtes Umschwenken mischen und beide Röhrchen 30 Minuten in einem Wasserbad von 37°C inkubieren.

Danach

10,0 ml 0,02 N NaOH	10,0 ml 0,02 N NaOH
-----	0,1 ml Serum

zugeben und mischen.

Anschließend wird die Farbdifferenz (Extinktionsdifferenz E) zwischen Probe und Leerwert in 10-mm-Küvetten bei 405 μ (zwischen 390 und 420 μ) ermittelt.

Berechnung der Aktivität

Es gilt eine Beziehung zwischen der gemessenen Extinktionsdifferenz und Phosphatase-Aktivität herzustellen.

Durch Logarithmierung der Gleichung des Lambert-Beerschen Gesetzes (siehe Testcombination saure Phosphatase!) ergibt sich, daß die Extinktion dem Produkt aus der Konzentration einer Lösung, der Schichtdicke und dem Extinktionskoeffizienten entspricht:

$$E = c \cdot d \cdot \varepsilon$$

c = Konzentration in Mol/l (1 = ml 10³)

d = Schichtdicke in cm

ε = Extinktionskoeffizient

Setzt man in die Gleichung die für unsere Versuchsanordnung gegebenen Werte ein, die der Einheitsdefinition der Phosphatase-Aktivität entsprechen, so erhält man den Umrechnungsfaktor von Extinktion auf Phosphatase-Einheit.

Definition der Aktivitäts-Einheit: 1 Phosphatase-Einheit (nach BESSEY, Mitarb.) ist die in 1 Liter Serum enthaltene Enzymmenge, die in 1 Std. bei 37°C 1 mMol = 140 mg p-Nitrophenol freisetzt.

Wenn in 1 l Serum 1mMol enthalten ist, dann befindet sich in 0,1 ml Serum nur 0,1 μ Mol. Da die Menge des entstehenden p-Nitrophenols der Enzymaktivität direkt proportional ist, wird bei einer Inkubationszeit von 1/2 Std. nur 1/2 · 0,1 μ Mol = 0,05 μ Mol (= 78 p-Nitrophenol) gebildet. Es ist also 0,05 μ Mol in 11,1 ml Testvolumen enthalten. Die Konzentration beträgt demnach 5×10^{-8} Mol pro $11,1 \times 10^{-3}$ Liter.

Die Schichtdicke der Meßlösung beträgt 1 cm.

Der molare Extinktionskoeffizient wird von der Fa.Boehringer bei 400 μ (Wellenlänge λ) und einem pH von 11,5 mit $18,8 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ angegeben. Setzt man die Werte in die Gleichung ein, erhält man:

$$4 E = \frac{5 \times 10^{-8} \times 1 \times 18,8 \times 10^3}{11,1 \times 10^{-3}} = 0,084$$

1 alkalische Phosphatase-Einheit nach BESSEY entspricht also einer Extinktionsdifferenz von 0,084. Bei einer Wellenlänge von 400 μ erhält man somit PhE-Werte durch Division der gemessenen Extinktionsdifferenz durch 0,084:

$$\frac{\Delta E_{400}}{0,084} = E_{400} \times 11,9 = \text{mMolE alkalische Phosph.}$$

Weiterhin ergibt sich:

$$\frac{\Delta E_{405}}{0,084} \times 12,0 = \text{mMolE alk. Phosphatase}$$

$$\Delta E_{420} \times 15,3 = \text{mMolE alk. Phosphatase}$$

Wir führten unsere Messungen mit dem Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 405 μ durch. Zur Vereinfachung der Umrechnung läßt sich ein Diagramm herstellen. Trägt man auf die Abszisse die Extinktions- und auf die Ordinate die mMolEinheiten auf, dann liegen sämtliche Bezugspunkte Ext./PhE auf der Geraden mit der Funktionsgleichung $y = 12x$.

Normalwerte für die alkalische Serumphosphatase:
0,9 - 4,1 mMole (SÜDHOF).

Im ersten Teil unserer Versuche benutzten wir als zweite vollquantitative Methode eine Versuchsanleitung unter Verwendung der Phosphatabs-Reagenzien (Phosphatabs Alkaline) der Fa. Warner Chilcott. Zugrunde liegt das Verfahren nach KLEIN, BABSON und READ mit dem Substrat Phenolphthaleinphosphat (19).

Prinzip: Die alkalische Phosphatase spaltet das Substrat Phenolphthaleinphosphat. Nach Zusatz des Farbentwicklers - einer eingestellten alkalischen Lösung - kommt es durch pH-Verschiebung zu einem Farbumschlag. Die Farbtintensität ist abhängig von der Menge des abgespaltenen Phenolphthalein und ist ein Maß für die Enzymaktivität.

Apparate: Zur Extinktionsmessung ist ein Photometer (z.B. Eppendorf) mit quadratischen Küvetten von 1 cm Schichtdicke erforderlich, Filter 550 μ . Für die Inkubation wird ein thermostatisch auf 37°C regulierbares Wasserbad benötigt.

Geräte:

Graduierte 5 ml-Teströhrchen

1 Vollpipette 0,5 ml

Stangenpipetten zu 0,2 ml mit ausgezogener Spitze (siehe vorher).

Chemikalien:

100 mg Phenolphthalein p.a.

100 ml 95%iger Alkohol

Reagenzien: In einer Packung Phosphatabs Alkaline sind enthalten:

Substrattabletten (Phenolphthaleinphosphat)

Farbentwicklerlösung (0,5 n NaOH)

Herstellung der Standardkurve

1.) Standardlösung: 100 mg Phenolphthalein p.a. mit 95%igem Alkohol auf 100 ml lösen. 1 ml der Lösung enthält 1 mg Phenolphthalein. 1 ml dieser Stammlösung wird mit dest. Wasser auf 50 ml verdünnt. Die Standardlösung enthält also 0,02 mg Phenolphthalein in 1 ml.

2.) In 6 auf 5 ml geeichte Teströhrchen werden folgende Mengen der Standardlösung pipettiert:

0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml, 2,5 ml, 3 ml entsprechend 0,01 mg, 0,02 mg, 0,03 mg, 0,04 mg, 0,05 mg und 0,06 mg Phenolphthalein.

3.) In jedes Teströhrchen werden 0,2 ml normales Serum oder Plasma zugegeben, 2 Tropfen Farentwickler zugefügt und mit dest. Wasser auf 5 ml aufgefüllt; gut durchmischen!

4.) Die Leerprobe wird mit 0,2 ml normalem Serum oder Plasma und 2 Tropfen Farentwickler angesetzt und mit dest. Wasser auf 5 ml verdünnt.

5.) Die Leerprobe wird bei einer Wellenlänge von 550 $m\mu$ auf 100% Transmission oder o.D. = 0 eingestellt, dann werden die Standardproben abgelesen.

6.) Standardkurve: Im Koordinatensystem werden auf der Abszisse optische Dichte bzw. Transmission, auf der Ordinate Milligramm Phenolphthalein eingetragen.

Arbeitsweise

1.) Zwei auf 5 ml geeichte Teströhrchen werden mit "Test" (T) und "Leerwert" (L) bezeichnet.

2.) Eine Substrattablette Phosphatabs Alkaline wird in das mit "T" bezeichnete Röhrchen gegeben.

3.) In beide Röhrchen werden je 0,5 ml dest. Wasser pipettiert und Röhrchen "T" so lange geschüttelt, bis sich die Tablette gelöst hat.

4.) Das mit "T" bezeichnete Röhrchen wird im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

5.) Mit einer 0,2 ml-Pipette in beide Röhrchen genau 0,2 ml Serum oder Plasma pipettieren. (Die Spitze der Pipette ist dabei genau über die Flüssigkeit zu halten, damit kein Serum am Röhrchenrand verloren geht.)

6.) Nach genau 30 Minuten Inkubationszeit bei 37°C 2 Tropfen Farentwickler zugeben und beide Röhrchen bis zur 5ml-Marke mit dest. Wasser auffüllen, mischen und sofort im Photometer bei einer Wellenlänge von 550 $m\mu$ gegen den Leerwert "L" ablesen.

7.) Das frei gewordene Phenolphthalein kann in mg auf der Standardkurve abgelesen werden. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wird dann nach der beiliegenden Umrechnungskurve in Bodansky-Einheiten (BE) bestimmt.

Anmerkungen:

Zur Inkubationszeit: Wenn schon vor 10 Minuten Inkubationszeit eine rosa Färbung auftritt, kann die Inkubation bei genau 10 Minuten beendet werden. 2 Tropfen Farentwickler zugeben, bis zur 5 ml-Marke mit dest. Wasser auffüllen und gegen den Leerwert bei 550^{mμ} im Photometer ablesen. Auf der Standardkurve werden die freigesetzten mg Phenolphthalein abgelesen. Die Bodansky-Einheiten werden wie oben beschrieben bestimmt, erst dann wird das Ergebnis mit 3 multipliziert, um das Endresultat zu erhalten. (Keinesfalls dürfen schon die mg Phenolphthalein mit dem Faktor 3 multipliziert werden, da keine lineare Proportionalität besteht).

Im zweiten Teil unserer Versuche benutzten wir anstelle der letzten Methode eine neuerdings von der amerikanischen Fa. Warner-Chilcott herausgebrachte Kombination Phosphatabs Alkaline Quantitative. Methode und Prinzip sowie die erforderlichen Apparate stimmen mit der eben beschriebenen überein.

Geräte:

Normale Reagenzgläser

1 Vollpipette 0,5 ml

Stangenpipetten zu 0,2 ml mit ausgezogener Spitze (siehe vorher)

Stangenpipetten zu 0,1 ml

Reagenzien:

In einer Packung Phosphatabs-Alkaline Quantitative sind enthalten:

Substrattabletten (Phenolphthaleinphosphat)

Farentwicklertabletten (eingestellte NaOH-Lösung)

2 Ampullen Standard-Phenolphthalein-Lösung

Herstellung der Standardkurve

Mit Hilfe der Standard-Phenolphthalein-Lösung werden be-

stimmte Konzentrationen hergestellt, die dann mit der im Photometer gemessenen Extinktionsdifferenz in Beziehung gesetzt werden.

1.) Aus einer Standard-Ampulle wird 1 ml Standard-Phenolphthalein-Lösung in einen 50 ml-Kolben pipettiert und dieser bis zur Marke mit dest. Wasser aufgefüllt. Gut mischen! Der Inhalt gilt als Standardlösung.

2.) In 6 graduierte 10 ml-Röhrchen (bzw. normale Reagenzgläser) werden nacheinander 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, zuletzt 3,0 ml Standardlösung pipettiert. Das entspricht einem Gehalt von 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Mikrogramm Phenolphthalein.

3.) In jedes Teströhrchen gibt man 0,2 ml Normalserum oder -plasma (Versatol ist hierzu sehr geeignet).

4.) In ein siebtes Teströhrchen, das als Leerwert dient, pipettiert man 0,2 ml Serum oder Plasma und anschließend 0,1 ml Farbewickler. Nach einer Verdünnung mit dest. Wasser auf 5,8 ml (genau 5,5 ml dest. Wasser zugeben) wird die Lösung in eine Küvette umgefüllt.

5.) In jedes Teströhrchen bis auf den Leerwert wird der Reihe nach gegeben: 0,1 ml Farbewickler, dann erfolgt Verdünnung auf 5,8 ml mit dest. Wasser (Bei Verwendung von normalen Reagenzgläsern fügt man in das erste Röhrchen mit 0,5 ml Standardlösung 5,0 ml, in das zweite 4,5 ml usw. bis 2,5 ml in das letzte hinzu). Gut mischen und in Küvetten umfüllen. Die Ablesung gegen den Leerwert erfolgt bei 550m μ .

6.) Trägt man die erhaltenen Extinktionswerte mit den korrespondierenden Phenolphthaleinmengen in ein rechtwinkliges Koordinatensystem (Abszisse: Ext.-Einheiten; Ordinate: Mikrogramm Phenolphthalein) ein, lassen sich die Punkte zu einer Kurve vervollständigen. Auf ihr liegen alle Bezugspunkte Ext./Mikrogramm Phenolphthalein.

Anmerkungen:

Zu 4. und 5.): Bei Verwendung von Geräten, die ein größeres Volumen als 5,8 ml zur Extinktionsmessung benötigen, kann man sämtliche Endvolumina um 5 ml auf 10,8 ml verdünnen.

Testverfahren

- 1.) Röhrchen mit "Test" (T) und "Leerwert" (L) beschriften.
- 2.) Eine Tablette Phosphatabs-Alkaline Quantitative wird in das "Test"-Röhrchen gegeben.
- 3.) 0,5 ml dest. Wasser in beide Röhrchen hineingeben. Das "Test"-Röhrchen wird bis zur Auflösung der Substrat-Tablette geschüttelt.
- 4.) Das "Test"-Röhrchen wird in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Der Leerwert braucht nicht inkubiert zu werden.
- 5.) Genau 0,2 ml Patientenserum (oder -plasma) werden in beide Röhrchen pipettiert. Dabei möglichst Spitze der Pipette direkt über dem Lösungsspiegel halten um zu verhindern, daß Serum am Glasrand verloren geht.
- 6.) Nach genau 30 Minuten Inkubation bei 37°C gibt man in beide Röhrchen 0,1 ml Farbentwickler. Danach genau 5 ml dest. Wasser zufügen. Mischen und bei 550m μ gegen den Leerwert ablesen.
- 7.) Mit Hilfe der Standardkurve läßt sich die freigesetzte Menge Phenolphthalein in Mikrogramm ermitteln.
- 8.) Eine von der Firma angegebene Konversionstafel und -kurve ermöglicht eine Umrechnung der Resultate in verschiedene Phosphatase-Einheiten.

Wir haben unsere Messungen in Bodansky-Einheiten (BE) umgerechnet. Trägt man in ein rechtwinkliges Koordinatensystem (Abszisse: Ext.E; Ordinate: BE) mit Hilfe der Konversionstafel und der Standardkurve die zu den angegebenen Bodansky-Einheiten korrespondierenden Extinktionswerte ein, erhält man eine Rechts-Links-Kurve. Sie geht durch den Nullpunkt des Koordinatensystems und weist in ihrem Mittelbereich einen stark gestreckten Verlauf auf. Auf ihr liegen sämtliche Bezugspunkte Ext-E/BE.

Anmerkungen:

Wenn schon vor einer Inkubationszeit von 10 Minuten eine rosa Färbung auftritt, kann die Inkubation nach genau 10 Minuten beendet werden. 0,1 ml Farbentwickler und 5,0 ml dest. Wasser werden nacheinander zugefügt; nach Mischung

wird gegen den Leerwert bei 550 abgelesen. Erst das endgültige Ergebnis in Phosphatase-Einheiten wird als "Zehn-Minuten-Ergebnis" mit drei multipliziert. (Eine Multiplikation der Mikrogramm Phenolphthalein mit drei ist unzulässig, da zwischen den Mikrogramm Phenolphthalein und den Phosphatase-Einheiten keine lineare Beziehung besteht).

2.) Halbquantitative Methoden

Wir testeten eine halbquantitative Schnellmethode ("Phosphatabs"), die in den Laboratorien der Warner-Chilcott Morris Plains N.J. entwickelt wurde und über die Firma Gödecke & Co vertrieben wird. Prinzip und Methode stimmen mit den für die Phosphatabs Quantitative beschriebenen überein. Zur Vereinfachung wird die Extinktionsmessung durch einen optischen Vergleich der Analysenfärbung mit einer beigelegten Farbskala ersetzt.

Apparate: Zur Abkürzung der Inkubationszeit empfiehlt sich ein Trockenthermostat mit einer Inkubationstemperatur von 37°C .

Geräte:

Für Analyse wird eine Meßpipette zu 0,2 ml benötigt. (Zweckmäßigerweise Stangenpipetten mit ausgezogener Spitze, siehe vorher). Kleine Glasstäbchen (i.d. Packung).

Reagenzien: In einer Phosphatabs-Acid bzw. -Alkaline-Packung befinden sich:

Substrattabletten (Acid: α -Naphthylphosphat
Alk.: Phenolphthaleinphosphat)

Entwicklertabletten: (Acid: bis-diazotiertes o-Dianisidin)

Entwickler-Lösung : (Alk.: eingestellte NaOH-Lösung)

Kühle Lagerung und Schutz vor Sonnenlicht sind zu beachten.

Arbeitsgang

1.) In ein Teswell (Teströhrchen) werden 4 Tropfen (=0,2ml) Patientenserum (oder -plasma) gegeben.

2.) Eine Substrattablette hinzufügen und mit einem Glasstäbchen bis zur völligen Auflösung zerdrücken.

3.) Ständer mit Analysenröhrchen inkubieren. Dabei wird die zur verwandten Inkubationstemperatur notwendige Inkubationszeit einer beiliegenden Tabelle entnommen (12' bei 37°C).

4.) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird für Phosphatabs-Acid eine Entwicklertablette zugegeben und zerdrückt. Danach genau 3 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen. Für Phosphatabs-Alkaline 1 Tropfen Farmentwickler hinzufügen und mit einem Holzstäbchen vermischen.

5.) Die entstandene Färbung wird bei Phosphatabs-Acid nach 3 Minuten, bei Phosphatabs-Alkaline sofort mit der Farbtafel verglichen.

Acid-Tafel: Sie enthält eine Spalte mit drei Standardfarben vom lichten Braun bis zum dunklen Rotbraun entsprechend einer sauren Phosphatase-Aktivität von 0,6 (normal), 1,0 (Grenzbereich) und über 2,5 (deutliche Erhöhung) Bodansky-Einheiten.

Alkaline-Farbtafel: Sie enthält drei Spalten (für nicht-ikterische, subikterische und ikterische Seren) mit je vier Standardfarben vom lichten Ocker über Zartrosa und Rot nach Tiefrot entsprechend einer alkalischen Phosphatase-Aktivität von 3 (normal), 6 (Grenzbereich), 12 (erhöht) und 22 (stark erhöht) Bodansky-Einheiten.

Anmerkungen:

Acid: Hämolytische Seren können nicht verwandt werden.

Alkaline: Die üblichen Antikoagulantien bis auf die Aethylendiamintetraessigsäure können bei der Blutentnahme benutzt werden.

Hämolytische Seren können falsche Werte vortäuschen. Die erhaltenen Werte sind nur bei Verwendung der mit der Testpackung gelieferten Teswells (Spezialteströhrchen) zutreffend.

Die genaue Einhaltung der Inkubationszeit ist unerlässlich. Die Farbtafel darf nicht längere Zeit dem Licht ausgesetzt werden.

Zur genaueren Bestimmung von Aktivitäts-Einheiten empfiehlt die Herstellerfirma bei Seren, deren entsprechende Farbtönung nicht mit den Standardfarben übereinstimmen, folgendes Verfahren:

1. Mit physiologischer Kochsalzlösung wird das Serum 1:2 bis 1:8 verdünnt. Dann wird die Analyse für alle Verdünnungsgrade wiederholt.
2. Der BE-Wert der Verdünnung, deren Farbintensität einer Standardfarbe entspricht, wird mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Das Ergebnis ist die gesuchte Phosphatase-Aktivität in Bodansky-Einheiten des Patientenserums.

III. Experimentelle Untersuchungen

a) Korrelation zwischen voll- und halbquantitativen Methoden.

1.) Mathematische Berechnung der Umrechnungsdiagramme. Bezugseinheit.

Um die von uns benutzten Bestimmungsmethoden wirksam vergleichen zu können, ist es zunächst nötig, sich auf eine günstige Phosphatase-Einheit festzulegen.

Zweckmäßigerweise wird man dazu eine Einheit verwenden, die erstens beim überwiegenden Teil der benutzten Methoden angegeben und zweitens allgemein bekannt ist. Da für sämtliche Phosphatase-Methoden Angaben in Bodansky-Einheiten bestehen, wählen wir sie als allgemeine Bezugseinheit. Es müssen dann nur noch die mMol-Einheiten der von der Fa. Boehringer herausgebrachten Methode (p-Nitrophenol) in BE umgewandelt werden. Diese Umrechnung ist mit Hilfe von Umrechnungsdiagrammen bzw. -tabellen nach SÜDHOF (11) möglich.

α)saure Phosphatase

αα)p-Nitrophenol-Methode (Boehringer)

Einheit: mMolE Funktionsgleichung: $y = 2,81 x$ (I)

Y:mMolE; x:Ext.

Die Umrechnung nach SÜDHOF muß nach Diagrammen vorgenommen werden (11). Das Umrechnungsdiagramm HE (Huggins-Einheiten): Bodansky-Einheiten (BE) hat die Funktionsgleichung:

$$y = mx + n \text{ (II) } y:\text{HE}; x:\text{BE}$$

Weiterhin ist:

$$m = \operatorname{tg} \alpha = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad \text{(III)}$$

Mit dem Stechzirkel läßt sich feststellen, daß im SÜDHOF-schen Diagramm 59,7 mm 5,0 BE bzw. 50 HE entsprechen. 1 mm entspricht somit $5,0 : 59,7 = 0,0837$ BE bzw. $50 : 59,7 = 0,837$ HE.

Zu den Werten $y_1=10$ HE und $y_2=15$ HE finden sich die x-Werte: $x_1=27,9$ (mm) $\times 0,084 = 2,34$ BE und $x_2=49,7 \cdot 0,084 = 4,16$ BE. Werden diese Werte in (III) eingesetzt, ergibt sich:

$$m = \frac{15 - 10}{4,16 - 2,34} = \frac{5}{1,82} = 2,74$$

Aus (II) wird:

$$\begin{aligned} y &= 2,743x + n & n &= y - mx \\ n &= 15 - 4,16 \cdot 2,743 = 15 - 11,43 = 3,57 \\ n &= 10 - 2,34 \cdot 2,743 = 10 - 6,43 = 3,57 \end{aligned}$$

Die Funktionsgleichung des Umrechnungsdiagramms HE:BE lautet:

$$y = 2,743x + 3,57 \quad y:\text{HE}; x:\text{BE} \quad (\text{IVa})$$

Für die Abweichung ergibt sich:

$$\begin{aligned} 2 d &= 4,3 \text{ (mm)} \cdot 0,037 = 3,6 \text{ HE} \\ d &= 1,8 \text{ HE} \end{aligned}$$

Die Funktionsgleichungen der beiden Abweichungen sind:

$$\begin{aligned} d_1: y &= 2,743x + 5,37 & (\text{IVb}) \\ d_2: y &= 2,743x + 1,77 & (\text{IVc}) \end{aligned}$$

Aus einem zweiten Diagramm mMolE:HE ergibt sich genau:

$$1 \text{ mMolE} = 10 \text{ HE} \quad (\text{V})$$

Unter Beachtung von (V) folgt aus (IV):

$$\begin{aligned} y &= \frac{2,743x + 3,57}{10} \\ y &= 0,2743x + 0,357 \quad y:\text{mMolE}; x:\text{BE} \quad (\text{VIa}) \end{aligned}$$

Ebenso ist:

$$\begin{aligned} d_1: y &= 0,2743x + 0,537 & (\text{VIb}) \\ d_2: y &= 0,2743x + 0,177 & (\text{VIc}) \end{aligned}$$

Nun müssen die Gleichungen nach x aufgelöst werden:

$$x = \frac{y - 0,357}{0,2743} = 3,64y - 1,3 \quad (\text{VIIa})$$

$$\begin{aligned} d_1: x &= 3,64 y - 1,953 & (\text{VIIb}) \\ d_2: x &= 3,64 y - 0,645 & (\text{VIIc}) \end{aligned}$$

Schließlich wird (I) in (VII) eingesetzt; dabei wird das x (BE) aus (VII) zu y:

$$y = 3,64 \cdot 2,81x - 1,3$$

$$= 10,23 x - 1,3 \text{ (VIIIa) } y:BE; x:Ext.$$

$$d_1: y = 10,23 x - 1,95 \text{ (VIIIb)}$$

$$d_2: y = 10,23 x - 0,645 \text{ (VIIIc)}$$

Zusammenfassend ergibt sich für die Umrechnung Extinktion der p-Nitrophenol-Methode (Boehringer) zu BE:

$$\boxed{y = 10,23x - 1,3 \pm 0,655} \quad \text{(VIII) } y:BE; x:Ext.$$

Die Funktionsgleichung (VIII) läßt sich zeichnerisch darstellen (Diagramm Nr.1).

ββ) Quantitative Phosphatabs-Methode I

Substrat: α-Naphthylphosphat Einheit: Babson-Read-Einheit (BRE)
Zwei Formeln sind angegeben:

$$\frac{o.D.L}{o.D.St} \cdot 20 - 1,1 = \text{mg } \alpha\text{-Naphthol/Std.} = \text{BRE} \quad \text{(Ia)}$$

$$\frac{o.D.P}{o.D.St} \cdot 20 - 1,1 = \text{mg } \alpha\text{-Naphthol/Std.} = \text{BRE} \quad \text{(Ib)}$$

(Zeichenerklärung: o.D. = optische Dichte (Ext) des L(eerwertes gegen Wasser), des St(andards) und des P(atienten-serums)).

Nach der Vorschrift erhält man durch Multiplikation der BRE mit 0,18 Bodansky-Einheiten (BE):

$$\frac{o.D.P(L)}{o.D.St} \cdot 3,6 - 0,2 = \text{BE} \quad \text{(II)}$$

Für o.D.L erhielten wir 0,011 und für o.D.St 0,425. Beide Resultate bilden den Mittelwert aus je drei Bestimmungen. Der Wert für o.D.St läßt sich in (II) einsetzen:

$$o.D.P(L) \cdot \frac{3,6}{0,425} - 0,2 = \text{BE}$$

Bezeichnet man o.D.P(L) mit x und BE mit y, so ergibt sich folgende Funktionsgleichung:

$$y = 8,47 x - 0,2 \quad \text{(III) } y:BE; x:Ext.$$

Vergleichen wir (Ia) mit (Ib) und (III), so leuchtet ein, daß für $x = o.D.L = 0,011$ y gleich Null sein muß; denn der Leerwert enthält kein Enzym. Wir erhalten jedoch:

$$\begin{aligned} y &= 8,47 \cdot 0,011 - 0,2 \\ &= 0,0932 - 0,2 \\ &= - 0,1068 \end{aligned}$$

Daraus folgt, daß wir zur Funktionsgleichung noch 0,1068 hinzufügen müssen, damit die Bedingung $y = 0$ für $x = o.D.L = 0,011$ erfüllt ist. Dadurch wird der Wert $-0,2$ gleich n , der den Abstand des Schnittpunktes der Geraden $y = mx - n$ mit der y -Achse von der x -Achse angibt, zu $-0,0932$ verändert. Aus (III) wird demnach:

$$\boxed{y = 8,47 x - 0,1} \quad (IV)$$

Ein ähnliches Ergebnis erhält man, wenn man von der durch Versuche exakt bestimmbareren Funktionsgleichung für die quantitative Phosphatabs-Methode II ausgeht. Sie wird daher hier vorweggenommen (Herleitung siehe später):

$$y = 10,3 x - 0,52 \quad (V)$$

Die Extinktion wird durch die Gleichung

$$E = c \cdot d \cdot \epsilon \quad \text{bestimmt.}$$

Der Extinktionskoeffizient ϵ sowie die Schichtdicke d (1cm) sind in beiden Methoden gleich und können als Konstante zusammengefaßt werden:

$$E = \text{konst.} \cdot c$$

Die Konzentration wird hier der Einfachheit halber in Mol/ml angesehen. Unter der Voraussetzung, daß eine Tablette Phosphatabs-Acid die gleiche Menge an Substrat- bzw. Entwickler-substanz enthält wie eine Tablette Phosphatabs-Acid-Quantitative, wird die unterschiedliche Extinktion nur durch die unterschiedlichen Volumina bestimmt: $V_I = 5\text{ml}$, $V_{II} = 5,8 \text{ ml}$. Daraus ergibt sich:

$$E_1 = \frac{\text{konst.} \cdot a}{5} \quad E_2 = \frac{\text{konst.} \cdot a}{5,8}$$

Weiterhin ist

$$\frac{E_2}{E_1} = \frac{\text{konst.} \cdot a}{\text{konst.} \cdot a} \cdot \frac{5,0}{5,8} = 0,862, \quad E_2 = E_1 \cdot 0,862 \quad (Va)$$

Setzt man (Va) für x in (V) ein, erhält man:

$$\begin{aligned} y &= 10,3 \cdot 0,862 x (E_2) - 0,52 \\ &= 8,88 x - 0,52 \quad x: E_1 \end{aligned}$$

Hier interessiert uns nur die Steigung m, der Faktor vor x.

Wir erhalten also die Funktionsgleichung:

$$y = 8,88 x - n \text{ (VI) } y:BE; x:Ext. = E_1$$

Für den Punkt P der Funktionsgleichung mit den Koordinaten

$x_P = 0,011$ und $y_P = 0$ ergibt sich dann:

$$0 = 8,88 \cdot 0,011 - n$$

$$n = 0,0978 = 0,1$$

Die vollständige Funktionsgleichung lautet demnach:

$$\boxed{y = 8,88 x - 0,1} \quad \text{(VII)}$$

Zur Verringerung der Fehlerbreite schlagen wir vor, aus den abschließenden Funktionsgleichungen (IV) und (VII) das arithmetische Mittel zu bestimmen:

$$y = 8,47 x - 0,1 \quad \text{(IV)}$$

$$\underline{+y = 8,88 x - 0,1} \quad \text{(VII)}$$

$$\underline{2y = 17,35 x - 0,2} \quad :2$$

$$\boxed{y = 8,68 x - 0,1} \quad \text{(VIII) } y:BE; x:Ext.$$

Die Funktionsgleichung (VIII) läßt sich graphisch darstellen (Diagramm Nr.2).

γγ) Quantitative Phosphatabs-Methode II

Substrat: α-Naphthylphosphat Einheit: BRE • 0,18 = BE

Laut Anleitung der Firma sind die Versuchswerte zur Herstellung eines Umrechnungsdiagramms von Extinktion auf BRE (Babson-Read-Einheiten) nur dann brauchbar, wenn sie auf einer Geraden liegen. Dieser Voraussetzung entsprechen folgende Versuchsergebnisse:

0,00	BRE	:	0,050	(Ext.)	a
9,50	BRE	:	0,215	"	b
14,20	BRE	:	0,295	"	c
18,90	BRE	:	0,380	"	d

Lediglich der Wert für 4,7 BRE weicht mit seiner Extinktion von 0,148 deutlich von der Geraden ab, kann aber vernach-

lässt werden, da schon zwei Punkte einer Geraden sie eindeutig bestimmen. Nach der Zwei-Punkte-Formel beträgt die Steigung der Geraden mit der Funktionsgleichung $y = mx \pm n$:

$$m = \operatorname{tg} \alpha = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad (\text{I}) \quad y:\text{BRE}; x:\text{Ext.}$$

Aus den Versuchsergebnissen wählen wir zunächst die Wertepaare b und d und setzen sie in (I) ein:

$$m = \frac{18,9 - 9,5}{0,380 - 0,215} = \frac{9,4}{0,165} = 57$$

Zur Gegenprobe setzen wir a und b in (I) ein:

$$m = \frac{9,5 - 0}{0,215 - 0,050} = \frac{9,5}{0,165} = 57,5$$

Schließlich ergibt a und d in (I) eingesetzt:

$$m = \frac{18,9 - 0}{0,380 - 0,050} = \frac{18,9}{0,330} = 57,25 \quad (\text{II})$$

Wir übernehmen den letzten Wert, der den Mittelwert aus den beiden ersten Ergebnissen darstellt; unsere Funktionsgleichung lautet dann:

$$y = 57,25 x \pm n$$

Da für $y = 0$ $x = 0,050$ ist, d.H. die Gerade die positive x-Achse des rechtwinkligen Koordinatensystems schneidet, muß ihre Abweichung auf der y-Achse vom Nullpunkt des Systems negativ sein:

$$y = 57,25 x - n \quad (\text{III})$$

Für den Punkt P ($y=0, x=0,050$) erhält man:

$$0 = 57,25 \cdot 0,050 - n$$

$$n = 2,86$$

Damit lautet die vollständige Gleichung:

$$y = 57,25 x - 2,86 \quad (\text{IV}) \quad y:\text{BRE}; x:\text{Ext.}$$

Durch Multiplikation mit 0,18 erhält man die Funktionsgleichung des Umrechnungsdiagramms von Extinktion auf Bodansky-Einheiten:

$$y = (57,25 x - 2,86) \cdot 0,18$$

$y = 10,3 x - 0,52$

 $y:\text{BE}; x:\text{Ext.}$

Ihre graphische Darstellung zeigt Diagramm Nr. 2.

β) alkalische Phosphatase

αα) p-Nitrophenol-Methode (Boehringer)

Einheit: mMolE Funktionsgleichung: $y = 12x$ (I)

y : mMolE; x : E_{405}

Nach SÜDHOF (11) besteht zwischen mMolE und BE folgende Beziehung:

$$n \text{ mMolE} = 2n - 0,8 \text{ BE} \quad (\text{II})$$

$$n \text{ BE} = 0,5 n + 0,4 \text{ mMolE}$$

Nach (II) folgt aus (I):

$$y = 2 (12x) - 0,8 \quad y: \text{BE}; x: \text{Ext.}_{405}$$

$$\boxed{y = 24 x - 0,8} \quad (\text{III})$$

Diagramm Nr.3 bringt die zugehörige graphische Darstellung.

ββ) Phosphatabs-Alkaline-Quantitative I

Substrat: Phenolphthaleinphosphat

Die nach Vorschrift durchgeführten Standardversuche zur Herstellung einer Beziehung zwischen Extinktion und Mikrogramm Phenolphthalein ergaben folgende Werte:

Phenolphth.	Ext. ₅₅₀ = x	Mittelwert $\bar{x}$
10	0,155	0,177
	0,190	
	0,185	
20	0,350	0,361
	0,374	
	0,360	
30	0,540	<u>0,540</u>
	0,540	
	0,540	
40	0,710	0,715
	0,725	
	0,720	
50	0,890	<u>0,900</u>
	0,900	
	0,910	
60	1,200	1,200
	1,200	
	1,200	

Bis auf den letzten Extinktionswert von 1,200 liegen die Punkte annähernd auf einer Geraden. Diese Beobachtung stimmt mit der Angabe bei der Methode von HUGGINS-TALALAY (21,22), daß Extinktion und Mikrogramm Phenolphthalein in einem direkten proportionalen Verhältnis stehen, überein. Unter der weiteren Berücksichtigung, daß mit steigendem Extinktionswert - vor allem bei Überschreitung von 1,00 - der methodische und Ablesungsfehler zunehmen, können wir den letzten Extinktionswert vernachlässigen. Die direkte Proportionalität zwischen Extinktion und Mikrogramm Phenolphthalein findet ihren Ausdruck in der Funktionsgleichung:

$$y = mx \pm n \quad (I) \quad y: \text{Phth. } x: E_{550}$$

Die Steigung m der Geraden berechnen wir nach der Zweipunkte-Formel, indem wir zwei Punkte, die mit der größten Genauigkeit und Differenz auf der Geraden bestimmt wurden, auswählen:

$$P_1(y_1=30; x_1=0,540) \quad P_2(y_2=50; x_2=0,900)$$

$$m = \tan \alpha = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} = \frac{50 - 30}{0,900 - 0,540} = \frac{20}{0,360} = 55,5$$

Danach wird aus (I):

$$y = 55,5 x \pm n$$

Zur Vereinfachung der Rechnung können wir annehmen, daß die Gerade den Nullpunkt des Koordinatensystems schneidet. Das bedeutet, daß bei einer Meßlösung ohne Phenolphthalein die Extinktion gleich Null wird. In Wirklichkeit ist sie jedoch äußerst gering, so daß der in unserer Rechnung auftretende Fehler vernachlässigt werden kann. Damit lautet die Funktionsgleichung, die die Beziehung zwischen Extinktion und Mikrogramm Phenolphthalein ausdrückt:

$$y = 55,5 x \quad (II) \quad (\text{Diagramm Nr.4})$$

Die weitere Umrechnung auf Bodansky-Einheiten nehmen wir im Zusammenhang mit der Berechnung für die zweite Phospha-

tabs-Methode vor, da sie mit ihr zusammen übersichtlicher dargestellt werden kann.

γγ) Phosphatabs-Alkaline Quantitative II

Substrat: Phenolphthaleinphosphat

Folgende Versuchswerte drücken die Beziehung zwischen Extinktion und Mikrogramm Phenolphthalein aus:

Phenolphth.	Ext. ₅₅₀ = x	Mittelwert $\bar{x}$	
10	0,138 0,136	<u>0,137</u>	a
20	0,300 0,308	<u>0,304</u>	b
30	0,470 0,430	0,450	c
40	0,640 0,640	<u>0,640</u>	d
50	0,710 0,800	0,755	e
60	0,970 0,970	<u>0,970</u>	f

Bis auf die Werte c und e liegen auch hier die Punkte auf einer Geraden. Unter der Berücksichtigung des eben Gesagten läßt sich die Steigung wieder nach der Zwei-Punkte-Formel unter Verwendung der Werte a, b, d und f berechnen:

$$a \text{ und } d: m_1 = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} = \frac{40 - 10}{0,640 - 0,137} = \frac{30}{0,503} = 59,6$$

$$a \text{ und } b: m_2 = \frac{20 - 10}{0,304 - 0,137} = \frac{10}{0,167} = 59,9$$

$$d \text{ und } f: m_3 = \frac{60 - 40}{0,970 - 0,640} = \frac{20}{0,330} = 60,6$$

$$b \text{ und } f: m_4 = \frac{60 - 20}{0,970 - 0,304} = \frac{40}{0,666} = 60,0$$

Aus den vier berechneten Werten ergibt sich als Mittelwert $m = 60,0$. Er wird in (I) eingesetzt; auch hier nehmen wir an, daß die Gerade den Nullpunkt des Koordinatensystems schneidet:

$$y = 60 x$$

$$(III) y: \text{Phth}; x: E_{550}$$

(Diagramm Nr.4)

Zur Umrechnung von Mikrogramm Phenolphthalein auf Bodansky-Einheiten benutzen wir für beide Methoden eine von der Herstellerfirma mitgelieferte Umrechnungstabelle bzw. ein Umrechnungsdiagramm. Bei ausschließlicher Benutzung der Tabellenwerte ergibt die zeichnerische Darstellung eine Kurve von stark mäandrierendem Verlauf. Wir haben deshalb die Wertunterschiede zwischen Tabelle und Diagramm berücksichtigt und ausgeglichen: Das Ergebnis ist eine S-förmig gekrümmte Kurve nicht berechenbarer Funktionsgleichung, zu der deshalb eine Wertetabelle unerlässlich ist.

Zur Berechnung der zugehörigen Extinktion werden die Gleichungen (II) und (III) nach x aufgelöst:

$$\text{Methode I: } x_I = y_I: 55,5 = 0,018 y_I$$

$$\text{Methode II: } x_{II} = y_{II}: 60,0 = 0,0167 y_{II}$$

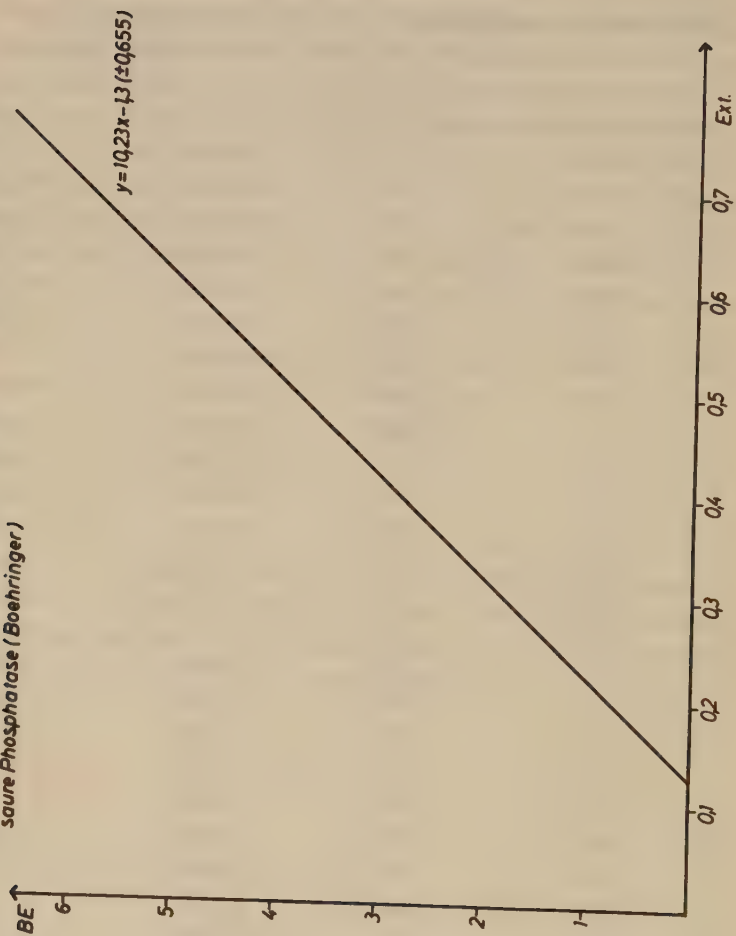
Mit Hilfe der nachfolgenden Wertetabelle lassen sich zwei gestreckte s-förmige Kurven zeichnen, deren Wendepunkte im mittleren Bereich zwischen 9 und 16 BE entsprechend einer Extinktion von etwa 0,350 bis 0,650 liegen. Sie sind in den Diagrammen Nr.5 und Nr.6 wiedergegeben.

W E R T E T A B E L L E

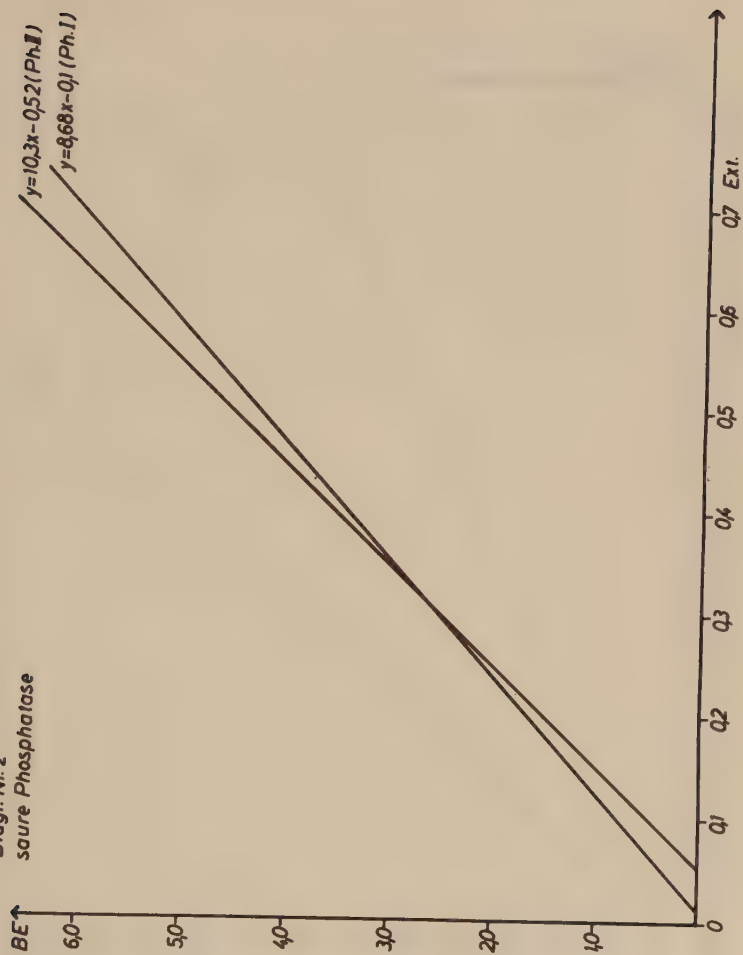
zum Umrechnungsdiagramm BE (y) / Extinktion (x)

y	Phth	x _I	x _{II}
1,0	1	0,018	0,0167
3,0	3,5	0,063	0,0585
3,5	4	0,072	0,0668
4,0	5	0,090	0,0835
4,5	6	0,108	0,101
5,0	6,9	0,125	0,115
6,0	9,2	0,166	0,154
6,5	10,5	0,190	0,175
7,0	12,0	0,216	0,200
7,5	13,4	0,242	0,222
8,0	14,7	0,268	0,246
9,0	18,2	0,328	0,304
9,5	19,8	0,357	0,330
10,0	22,0	0,392	0,364
10,5	23,6	0,425	0,394
11,5	27	0,486	0,451
12,0	28,7	0,517	0,480
12,5	30,5	0,550	0,508
13,0	31,8	0,573	0,532
14,0	34,8	0,626	0,582
14,5	36,0	0,648	0,602
15,5	38,8	0,698	0,648
16,0	40,0	0,720	0,668
17,0	42,3	0,762	0,707
17,5	43,5	0,783	0,727
18,5	45,5	0,820	0,760
19,5	47,5	0,855	0,794
21,0	50,0	0,900	0,835

Diagr. Nr.1
saure Phosphatase (Boehringer)

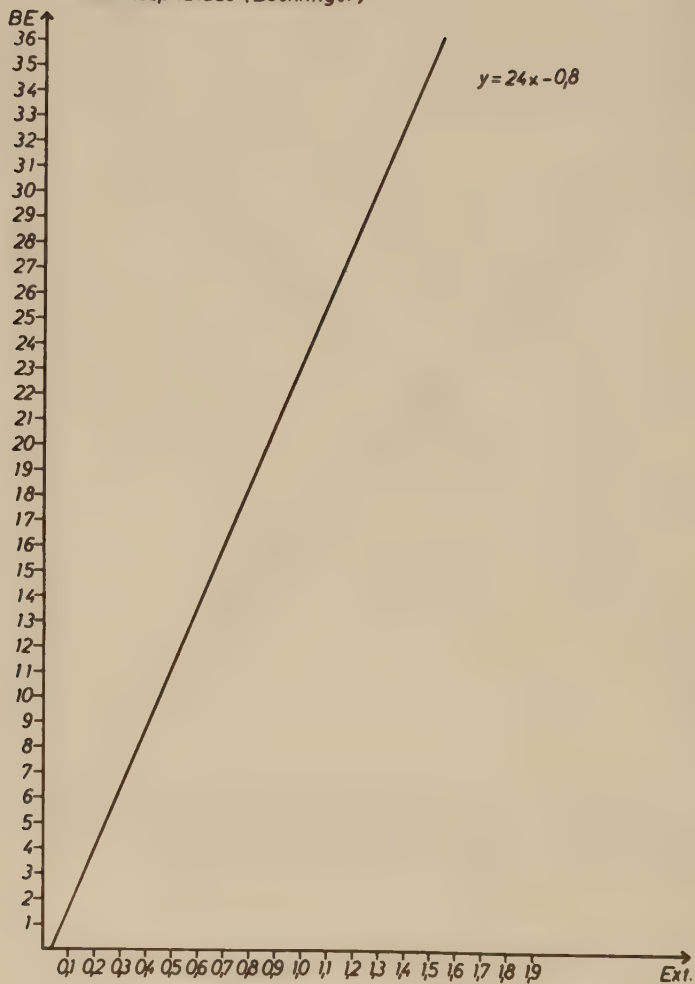


Diagr. Nr. 2
saure Phosphatase

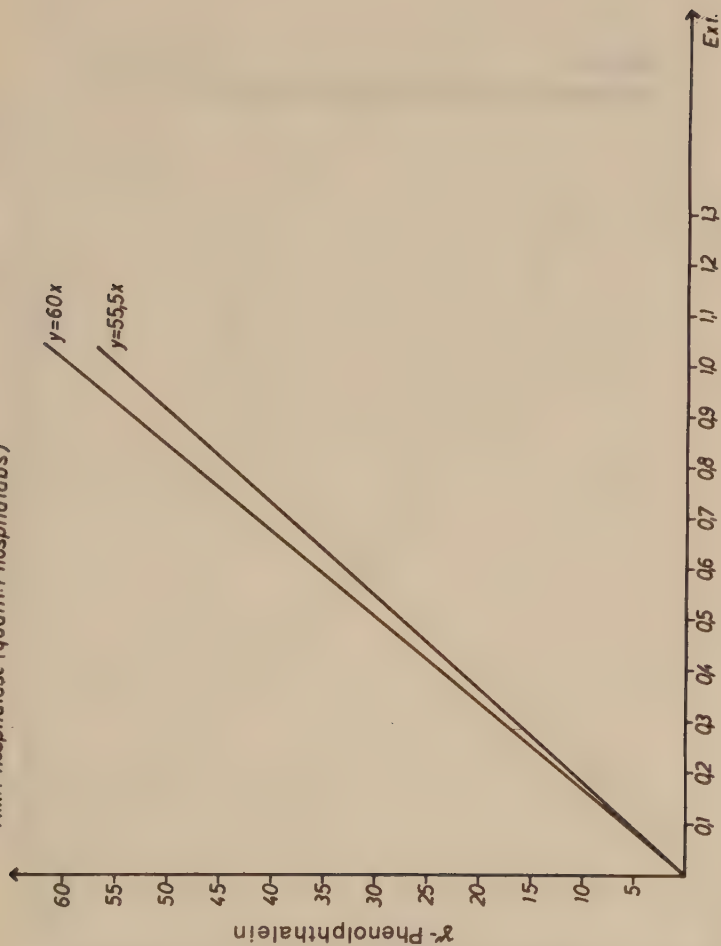


Diagr. Nr. 3

Alk. Phosphatase (Boehringer)

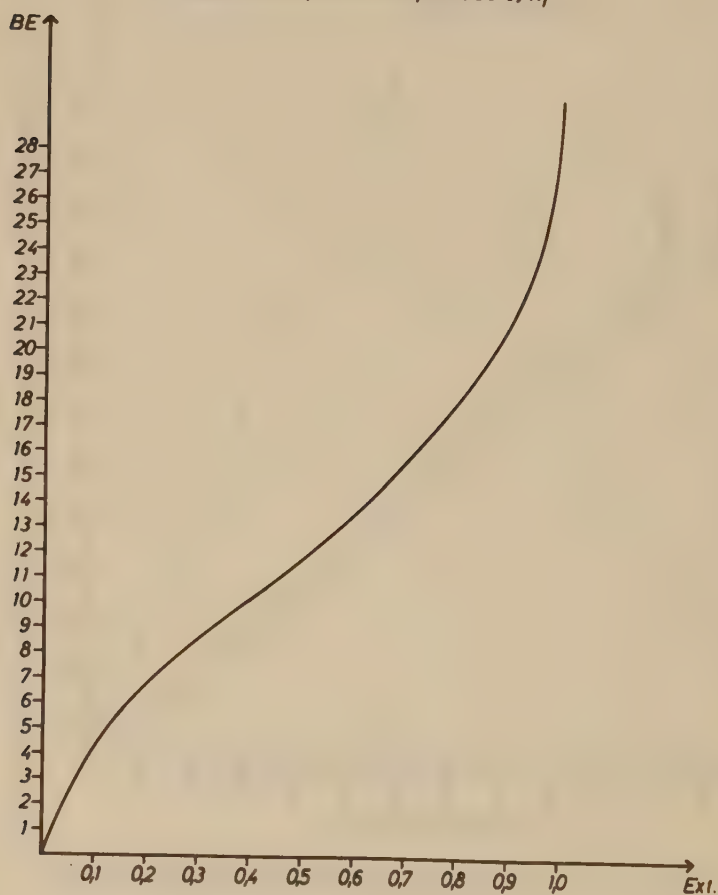


Diagr. Nr. 4
Alk. Phosphatase (quant. Phosphatase)



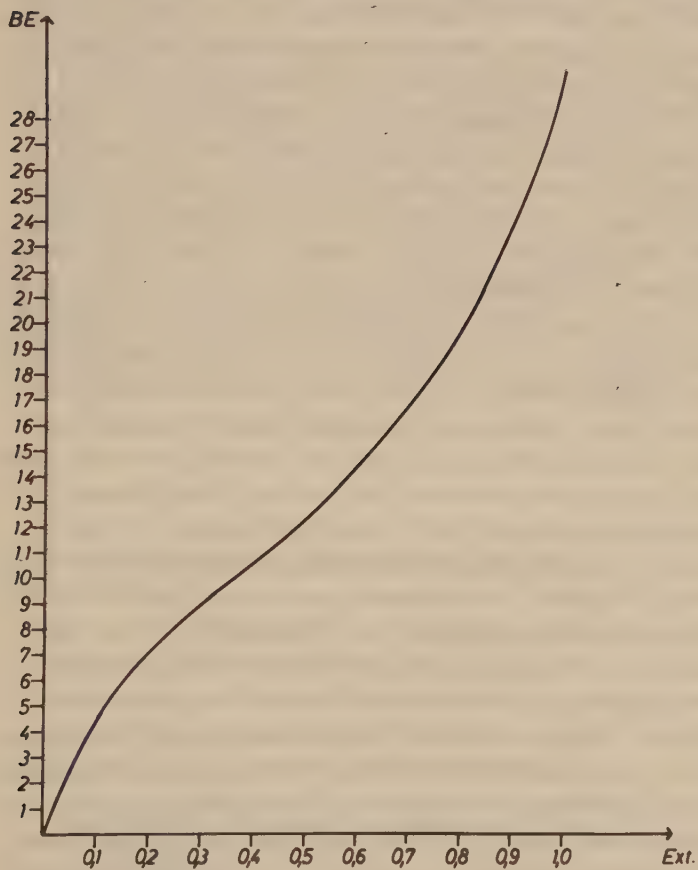
Diagr. Nr. 5

Alk. Phosphatase (quant. Phosphatabs 1) X_1



Diagr. Nr.6

Alk. Phosphatase (quant. Phosphatabs II) $\times_2$



2.) Das Untersuchungsmaterial

α) saure Phosphatase: Auswahlbedingungen und Ergebnisse

Wir waren bemüht, mit unserer Auswahl der Seren ein möglichst weitreichendes Spektrum von normalen bis stark erhöhten Aktivitätswerten zu erhalten. Die normalen Werte bezogen wir aus den "üblichen" Seren, die in einer großen Klinik bei der täglichen Routine-Untersuchung anheimfallen. Sie stammen von einem Patientengut, dessen Krankheitsdiagnose die saure Serumphosphatase unbeeinflusst läßt. Als für unsere Zwecke pathologisch kamen nur die Seren an Prostata-Carcinom Erkrankter in Frage. Aber auch hier zeigte sich nicht in allen Fällen eine deutliche Erhöhung der sauren Phosphatase im Serum. Dafür zeichnen zwei Gründe verantwortlich. Entweder hatte das Carcinom noch nicht zu stark infiltrierendem Wachstum und Bildung von Knochenmetastasen geführt - erst dann erfolgt ja ein starker Anstieg der Enzymaktivität -, oder die Patienten waren schon chirurgisch oder wurden seit längerem hormontherapeutisch behandelt. In zwei Fällen schließlich stießen wir auf eine sehr starke Aktivitätserhöhung der sauren Phosphatase, deren Bestimmung nur mit Hilfe von Verdünnung und halber Schichtlänge bei der Extinktionsmessung möglich war. Ein weiteres "Filter" zur Auswahl der Seren besteht in einer verstärkten Beschränkung auf Doppelwerte, die wir uns auferlegten. Während man sich nämlich normalerweise mit übereinstimmenden Doppelwerten derselben Methode zufrieden gibt, führten wir nur Stichproben durch, bei denen sich beide quantitative Methoden als zuverlässig erwiesen. Stattdessen glaubten wir durch die Übereinstimmung der mit zwei unabhängigen quantitativen Methoden ermittelten Werte eine strengere Auswahl zu treffen. Dieses Auswahlprinzip hat sich für die alkalische Phosphatase voll bewährt. Bei der sauren Phosphatase jedoch stießen wir auf nicht zu leugnende Schwierigkeiten. Nur einer großzügigen

Anwendung der auf dem SÜDHOFschen Diagramm basierenden Umrechnungsformel mit einer Streuung von $\pm 0,655$ BE ist es zu verdanken, daß wir etwa 58% der ursprünglichen 52 Fälle verwerten konnten. Die Gründe für diesen offensichtlichen Mangel an Übereinstimmung sind vielfältiger Art. Sie lassen sich nur mit Rücksicht auf die gute Übereinstimmung bei der alkalischen Phosphatase rechtfertigend andeuten.

Zuvor legen wir die unter den genannten Bedingungen erhaltenen Werte vor. Gemäß der getesteten Phosphatabs-Schnellmethode haben wir die Anzahl Fälle auf die angegebenen Indikatorgruppen I (0,6 BE), II (1,0 BE) und III (über 2,5 BE) verteilt. Dabei entfallen von insgesamt 29 Fällen 20 auf Gruppe I, 4 auf Gruppe II und auf Gruppe III 5 Fälle. Die folgende Aufstellung bringt ihre Aufschlüsselung mit den zugehörigen Werten.

Sämtliche Berechnungen wurden mit den im Text angeführten Umrechnungsformeln bzw. -diagrammen vorgenommen.

Zeichenerklärung der folgenden Aufstellung:

H(erkunft):

- 1 I. u. II. Medizinische Universitätsklinik München
- 2 Krankenhaus rechts der Isar
- 3 Krankenhaus Oberföhring
- 4 Poliklinik der Universität München
- 5 Chirurgische Universitätsklinik München

Q quantitative Phosphatabs-Methode (I und II)
B Boehringer-Methode
Ext. Extinktion
BE Bodansky-Einheiten
mMole Milli-Mol-Einheiten

Saure Phosphatase Gruppe I (0,6 BE)

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BE/mMolE	Ext.
1	F.A. Zustand nach Thrombose	I	0,030	0,16	0,29+0,655 0,435	0,155
1	S.I. z.B. Hepar	I	0,055	0,38	0,19+0,655 0,410	0,145
1	S.M. z.B. Hepar	I	0,054	0,37	1,06-0,655 0,645	0,230
1	H.M.	I	0,068	0,49	1,4-0,655 0,745	0,265
5	H.N. Prostata-Ca i.B.	I	0,057	0,395	0,67+0,655 0,540	0,192
5	G.H. Prostata-Ca i.B.	I	0,124 0,115	0,98 0,90	1,06-0,655 0,650	0,232 0,230
1	P.W. z.B. Hepar	I	0,072	0,525	0,9-0,655 0,600	0,214
1	S.S. Hepatitis epid.	I	0,067	0,48	0,37+0,655 0,455	0,162
1	D.G. gesund	I	0,065	0,465	0,6+0,655 0,520	0,185
1	K.D. chron.Pankreat.	I	0,072	0,525	0,85-0,655 0,590	0,216
1	D.T. Aortenstenose	I	0,072	0,525	0,19+0,655 0,408	0,145
1	B.C. Ulcus ventriculi	I	0,071	0,515	1,25-0,655 0,773	0,275
5	D.K. Prostata-Ca i.B. nach 24 Std.	I	0,067 0,073 0,060	0,48 0,53 0,42	0+0,655 -0,02+0,655 0,354 0,11+0,655	0,127 0,125 0,138
1	C.A. Asthma bronchiale	I	0,065	0,465	0,92-0,655 0,610	0,217
5	W.A. Prostata-Ca	II	0,082	0,325	-0,07+0,655 0,337	0,120

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BE/mMole	Ext.
5	Z.M. Prostata-Ca	II	0,065	0,15	0,08+0,655 0,380	0,135
2	M.N. Prostata-Ca	II	0,150 0,145	1,03 0,97	0,95-0,655 0,618	0,220 0,220
2	B.N.	II	0,115 0,105	0,67 0,56	-0,38+0,655 -0,38+0,655 0,257	0,090 0,090
2	R.N.	II	0,120 0,100	0,72 0,51	0,19+0,655 0,15+0,655 0,408	0,145 0,142
5	Z.M. Prostata-Ca	II	0,095	0,47	2x0,21 0,42+0,655 0,239	0,085

Saure Phosphatase Gruppe II (1,0 BE)

5	W.A. Prostata-Ca	I	0,082	0,61	1,4-0,655 0,745	0,265
1	B.M. Herzinfarkt	I	0,105	0,815	0,7+0,655 0,550	0,195
1	V.J.	I	0,115	0,9	1,62-0,655 0,800	0,285
5	G.H. Prostata-Ca i.B.	I	0,154 0,150	1,07 1,03	1,0+0,655 0,633 0,590	0,225 0,221

Saure Phosphatase Gruppe III (2,5 BE)

5	B.N.	I	0,217	1,79	2,23±0,655 0,970	0,345
1	A.A. Prostata-Ca met.	II	2,600	26,20	17,2 5,06	1,800
2	O.N.	II	0,170	1,23	1,1+0,655 0,662	0,235
2	S.N. Verd. auf Prostata-Ca nach 24 Std.	II	0,420	3,8	2+0,655 0,905	0,322
		II	0,355	3,13	0,54+0,655 0,507	0,180
	nach 48 Std.	II	0,295	2,7	1,85+0,655 0,872	0,310

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BE/mMole	Ext.
3	L.A.	II	3,100	31,0	50	5,000+
	nach 24 Std.	II	2,000	20	20	2,000+
	Prostata-Ca mit Lebermetastasen				5,62mMole	

Unter Berücksichtigung der vorliegenden Werte machen einige Faktoren die schlechte Übereinstimmung zwischen der quantitativen Phosphatabs- und der Boehringer-Methode (mit BE-Werten) verständlich:

1.) Im Vergleich zur alkalischen Phosphatase-Werteskala liegt die der sauren Phosphatase um eine Zehnerpotenz niedriger. Die Variationsbreite zwischen den einzelnen im Schnelltest unterschiedenen Gruppen liegt damit bei der sauren Phosphatase mit x (0,6 BE) - $ca. 2x$ (1,0 BE) - $4x$ (2,5 BE) gegenüber x (3 BE) - $2x$ (6 BE) - $4x$ (12 BE) und $ca. 6x$ (22 BE) der alkalischen Phosphatase beträchtlich niedriger. Das heißt aber, daß sie auf den sechsten (Intervall zwischen I und II) bzw. vierten (Intervall zwischen II und III) Teil verschmälert ist und dadurch die Auswahl einschränkt.

2.) Trotz der bestehenden Vergleichsmöglichkeit zwischen Bodansky- und Milli-Mol-Einheiten und ihrer zugehörigen Substrate, wie sie von SÜDHOF glaubhaft aufgezeigt wurde, kann man jedoch ihren Wert für die saure Phosphatase nur mit erheblichem Vorbehalt einschätzen. Diese Vorsicht erhellt aus der Tatsache, daß die endgültige Umrechnungsformel von mMole in BE einen Streuwert von $\pm 0,655$ BE ergibt (Hier wurde nur der Streuwert bei der Umrechnung von HE auf BE in dem SÜDHOFschen Diagramm berücksichtigt). Ein Streuwert aber, der in seiner absoluten Größe von rund 1,3 BE gleich zwei Testgruppen umfaßt, kann nur unbefriedigende Angaben über die Zugehörigkeit eines Serums zu einer dieser Gruppen zulassen. Wir haben deshalb bei der mit der Boehringer-Methode bestimmten Extinktion immer noch die ursprüngliche Angabe in mMole zugefügt. Immerhin

zeigt ein Vergleich mit den mMole-Werten bei Gruppe I nur in der Norm (Männer: 0,01 bis 0,56 mMole; Frauen: 0,03 bis 0,63 mMole, nach SÜDHOF) liegende oder mäßig erhöhte Werte.

3.) Der wichtigste Grund für eine mangelnde Übereinstimmung scheint uns jedoch in der Substratspezifität der verschiedenen sauren Phosphatase-Enzyme zu liegen. Darauf wiesen schon BABSON u. Mitarbeiter hin, als sie die Spezifität einzelner Substrate zur Erfassung der sauren Prostata-Phosphatase prüften (10). Nach ihren Angaben weist α -Naphthylphosphat die höchste relative Spezifität (= 98) für dieses Isoenzym gegenüber p-Nitrophenylphosphat mit dem Faktor 1,2 auf. Daraus folgt, daß eine Erhöhung dieses Enzyms im Serum von der quantitativen Phosphatabs-Methode mit einem maximalen Aktivitätswert angegeben werden muß, wohingegen die Boehringer-Methode (p-Nitrophenylphosphat) mit einem mäßigeren Anstieg antworten wird. Diese Feststellung gilt allerdings nur für erhöhte Werte der sauren Serumphosphatase, da heute angenommen wird, daß das Prostata-Isoenzym nur unter pathologischen Bedingungen im Serum erscheint (5,31). Für die Annahme eines unterschiedlichen Substrat-Einflusses spricht auch die Erfahrung, daß sich bei der säulenchromatographischen Untersuchung eines Serums mit extrem erhöhter saurer Phosphatase-Aktivität - aus technischen Gründen erstreckte sie sich über 24-48 Stunden - nur mit der quantitativen Phosphatabs-Methode das Enzym nachweisen ließ. Die Boehringer-Methode war nicht zu verwenden.

β) Alkalische Phosphatase: Auswahl des Materials und Ergebnisse der Untersuchungen.

Neben den Normalseren, die sich aus den Seren Gesunder bzw. Kranker mit nicht phosphatase-spezifischer Diagnose zusammensetzen, berücksichtigten wir die in dem Kapitel über die klinische Bedeutung der Serumphosphatasen aufgezählten spezifischen Krankheiten bei der Auswahl unserer pathologischen Seren. Hierzu zählt vor allem der Verschlußikterus. Außer dieser sachlichen Auswahl trafen wir noch eine technisch-methodische durch die Beschränkung, nur Seren mit annähernder Übereinstimmung in BE beider quantitativer Methoden zuzulassen. Sie erschien uns strenger als die normalerweise angestrebte Bestimmung eines Doppelwertes einer Methode. Die Bedingung ließ sich im überwiegenden Teil der Fälle erfüllen und soll in der folgenden Aufstellung demonstriert werden.

Die Fälle sind über die vier dem Schnelltest zugrunde liegenden Gruppen I (3 BE), II (6 BE), III (12 BE) und IV (22 BE) aufgeteilt. Davon entfallen von insgesamt 180 Seren auf Gruppe I 42, Gruppe II 73, Gruppe III 46 und 19 Fälle auf Gruppe IV. Die Aufstellung bringt die Aufschlüsselung der einzelnen Fälle nach Diagnose und Aktivitätswert in BE der beiden quantitativen Bestimmungsmethoden.

(Zeichenerklärung siehe saure Phosphatase)

Alkalische Phosphatase Gruppe I (3 BE)

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BoBE	Ext.
1	A.A. z.B. Hepar	I	0,050	2,5	3,1	0,160
1	E.G. Leberschaden	I	0,055	2,7	3,4	0,175
1	Ch.Ch. Linksinsuff.	I	0,068	3,2	3,6	0,185
1	H.G. Hepatitis epid.	I	0,052	2,7	3,1	0,160
1	Sch.M. Hypert.Emphysem Gastritis	I	0,118	4,8	4,7	0,230
1	E.H. Diab.mellitus	I	0,075	3,5	3,4	0,175
1	B.B. Thrombopenie	I	0,126	5,0	4,3	0,215
1	M.A. Toxoplasmose	I	0,100	4,3	5,0	0,240
1	R.M. Nephritis	I	0,090	4,0	4,1	0,205
1	B.D. Ischias	I	0,068	3,2	3,3	0,170
1	K.H. Glomustumor	I	0,043	2,2	2,8	0,150
1	M.L. Nephrolithiasis	I	0,060	2,9	3,1	0,160
1	K.W. Hypotonie	I	0,160	5,8	5,4	0,257
1	A.E. Aortenisthmus- stenose	I	0,110	4,6	4,3	0,216
4	S.G. Verschlußikterus	I	0,234	7,4	8,5	0,388

(Anmerkung: BoBE = BE nach der Boehringer-Methode)

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BoBE	Ext.
1	M.N. Tumor	I	0,096	4,2	4,6	0,225
1	G.G. Colitis	I	0,164	5,9	5,2	0,250
1	P.R. Nierenstein	I	0,126	5,0	3,9	0,195
1	K.K. hämolyt, Ikterus	I	0,057	2,8	3,2	0,168
1	S.N. Hypertension	I	0,070	3,3	2,8	0,148
1	A.F. Uterus-Ca bestr.	I	0,068	3,2	2,8	0,147
1	L.M. Nephropathie	I	0,142	5,4	6,1	0,286
1	Sch.R. essent. Hypert. Hyperlipidämie	I	0,095	4,1	4,3	0,216
5	W.T. Verschlußikterus	I	0,060	2,9	2,9	0,152
1	M.L. Herzinfarkt	I	0,085	3,8	3,7	0,187
1	Z.H. chron. Nephritis	I	0,060	2,9	4,0	0,200
1	W.K. Nephritis	I	0,040	2,0	2,7	0,145
1	P.N. Nierenkolik Nephritis	I	0,052	2,6	3,4	0,176
1	L.I. gesund	I	0,030	1,6	2,1	0,122
1	H.A. Verd. auf Cholelithiasis	I	0,080	3,6	3,4	0,175
5	D.K. Prostata-Ca	I	0,071	3,3	2,7	0,143

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BoBE	Ext.
1	Sch.J. Hypertonie	I	0,157	5,7	4,5	0,220
1	N.G. Mitralstenose	I	0,065	3,1	2,5	0,138
1	L.H. Mitralstenose	I	0,060	2,9	3,3	0,170
2	G.W. M.Hodgkin	II	0,183	6,7	7,1	0,330
5	D.O. Prostata-Adenom	II	0,160	6,1	4,9	0,235
5	M.G. Niereninsuff.	II	0,125	5,4	5,4	0,260
1	D.H. chron. Hepatitis	II	0,145	5,8	6,6	0,310
1	S.M. Zirrhose	II	0,080	3,9	3,9	0,195
1	B.F. Plasmocytom	II	0,110	4,8	5,5	0,265
4	P.A. dek. Cor pulm.	II	0,365	10,0	9,2	0,420
5	M.L. Cholelithiasis	II	0,225	7,6	7,1	0,330

Alkalische Phosphatase Gruppe II (6 BE)

1	K.K. Osteoporose	I	0,210	6,9	6,8	0,320
1	H.O. Hypertonie	I	0,135	5,2	6,5	0,300
1	W.H. ren.vasc.Prozeß?	I	0,177	6,2	6,7	0,314
1	V.K. prim.-chron. Polyarthrititis	I	0,243	7,5	6,5	0,300
1	M.B. Schlafmittelverg.	I	0,211	6,8	4,9	0,238

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BoBE	Ext.
1	R.A. Bronchial-Ca	I	0,180	6,3	6,2	0,291
1	W.J. allgemeine Gefäßsklerose	I	0,157	5,8	6,1	0,287
1	W.J. Zerebralsklerose	I	0,430	10,6	8,8	0,400
1	G.H. Colitis ulcerosa	I	0,095	4,1	4,1	0,207
1	S.W. Cholelithiasis	I	0,136	5,3	4,9	0,238
1	D.G. gesund	I	0,194	6,6	6,2	0,290
1	K.F. Herzinsuff.	I	0,315	8,7	9,2	0,420
1	J.B.	I	0,180	6,3	6,5	0,304
4	S.K. Verschlußikterus	I	0,395	10,1	9,4	0,430
1	K.N. Herzinfarkt	I	0,250	7,6	6,5	0,305
5	K.W. Verschlußikterus	I	0,333	9,1	9,0	0,410
5	D.K. Ileus, Osteopor.	I	0,365	9,6	7,7	0,355
5	S.E. Cholecystitis	I	0,457	11,0	10,2	0,462
1	P.A. Zustand nach Cholecystektomie	I	0,178	6,2	6,5	0,305
5	G.A. Met.-malignes Melanom	I	0,157	5,7	5,5	0,265
5	T.J. Myositis	I	0,177	6,2	5,3	0,255
1	P.A. Hyperthyreose	I	0,125	5,0	5,4	0,260

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BoBE	Ext.
1	N.M. Mamma-Ca	II	0,390	10,4	11,2	0,500
5	N.N. oper.Rectum-Ca Stenose beider Ureteren	II	0,420	10,9	10,6	0,475
5	W.M. Hyperchloräm.Acid. Dünndarmsackschlinge	II	0,270	8,4	7,9	0,365
2	P.F. Bronchial-Ca	II	0,217	7,4	7,1	0,330
2	Z.W. M.Hodgkin	II	0,430	11,1	10,0	0,450
2	G.W. Bronchial-Ca	II	0,350	9,8	8,8	0,400
2	K.N. Bronchial-Ca	II	0,442	11,3	10,1	0,458
2	K.K. Bronchial-Ca	II	0,157	6,1	5,3	0,252
2	D.R. Bronchial-Ca	II	0,117	4,9	4,3	0,215
2	E.M. M.Hodgkin	II	0,180	6,6	7,6	0,350
2	S.M. Firbrom	II	0,090	4,2	4,3	0,218
2	A.A. Bronchial-Ca	II	0,320	9,3	10,6	0,475
2	B.J. Magen-Ca	II	0,180	6,6	6,0	0,285
2	A.R. Bronchial-Ca	II	0,262	8,3	7,2	0,335
2	S.S. neopl. ventr.	II	0,243	7,9	7,6	0,350
4	E.G. Hepatitis epid.	II	0,295	8,9	9,8	0,445

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BoBE	Ext.
2	M.J. Bronchial-Ca	II	0,215	7,4	8,0	0,370
2	F.A. Bronchial-Ca	II	0,160	6,1	5,9	0,275
2	M.S. Bronchial-Ca	II	0,150	5,9	5,9	0,275
2	G.N. Bronchial-Ca	II	0,300	9,0	9,9	0,445
5	B.A. Lungentumor	II	0,160	6,1	5,3	0,255
5	P.J. Prostata-Adenom	II	0,110	4,8	4,9	0,238
1	Z.A. Alk. Leberzirrhose	II	0,175	6,5	6,2	0,290
2	H.A. Verschlußikterus	II	0,330	9,4	8,7	0,395
1	P.N. Hepatitis epid.	II	0,150	5,9	5,7	0,270
1	P.B. Leberzirrhose	II	0,200	7,1	6,5	0,305
1	T.N. Leberparenchym- Schädigung	II	0,085	4,0	3,8	0,190
2	H.N. Rectum-Ca	II	0,165	6,3	5,5	0,262
2	L.N. ben.Prost.Sigm.	II	0,182	6,7	6,6	0,310
3	L.A. Prostata-Ca mit Lebermetastasen	II	0,323	9,3	9,1	0,415
1	F.H. Met. Melanosarkom	II	0,520	12,7	13,3	0,588
1	P.M. Struma	II	0,380	10,3	12,5	0,560
2	P.N. Hepatitis epid.	II	0,490	12,1	12,5	0,560

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BoBE	Ext.
5	P.N. Magen-Ca	II	0,173	6,4	5,4	0,260
5	S.A. Pankreascyste	II	0,405	10,7	11,2	0,502
1	Z.A. Alk.Leberzirrhose	II	0,165	6,2	5,6	0,265
5	K.X. Ileus	II	0,245	8,0	8,0	0,368
5	S.G. Hypernephrom Prostata-Adenom	II	0,202	7,1	8,1	0,375
1	R.A. Mediastinaltumor	II	0,237	7,8	7,6	0,352
5	O.M. Prostata-Adenom	II	0,134	5,5	6,1	0,290
5	H.H. Prostata-Ca	II	0,165	6,2	5,5	0,265
1	K.M. Mamma-Ca	II	0,227	7,7	7,8	0,360
1	E.K. leichter Ikterus	II	0,225	7,6	8,7	0,395
1	B.N. Hepatitis	II	0,185	6,7	6,5	0,305
1	T.N. cholangitische Leberschädigung	II	0,185	6,7	5,8	0,275
4	S.K. Osteoporose Spondylarthrosis deformans	I	0,440	10,7	8,6	0,392
4	J.F. Osteoporose Spond. deformans	I	0,552	12,6	8,3	0,380
2	G.W. Bronchial-Ca	II	0,350	9,8	8,8	0,400
2	W.N. Bronchial-Ca	II	0,152	3x5,9 17,7	15,3	0,670

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BoBE	Ext.
1	H.M. Leberzirrhose	II	0,290	8,8	6,4	0,300
5	U.M. Magen-Ca oper. Pankreas-Ca	II	0,400	10,6	9,2	0,420

Alkalische Phosphatase Gruppe III (12 BE)

1	K.K. Hepatopathie	I	0,710	15,8	15,2	0,670
1	E.F. Verschlußikterus	I	0,660	14,7	13,1	0,580
1	B.N. Hepatitis	I	0,740	16,4	18,4	0,800
4	F.L. Leberzirrhose portale Hypertension	I	0,528	12,2	14,2	0,630
1	K.F. Leberzirrhose	I	0,585	13,2	13,1	0,580
1	P.A. Herzinfarkt	I	0,770	17,2	16,6	0,728
1	S.E. akuter cholang. Schub, Leberparen- chymschädigung	I	0,910	21,4	22,2	0,960
1	H.E. Magen-Ca	I	0,543	12,4	11,9	0,533
1	L.A. Leberzirrhose	I	0,670	3x14,9 44,7	44,8	1,900+
2	G.M. Pankreatitis	II	0,640	15,3	15,0	0,660
2	A.N. M. Paget	II	0,520	12,7	14,8	0,650
2	S.F. unklar	II	0,585	14,2	16,3	0,715
5	L.F. Zust. nach Magenresektion	II	0,700	16,8	17,6	0,770

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BoBE	Ext.
1	B.E. Hepatitis	II	0,355	9,9	11,2	0,500
1	R.N. Hepatitis epid.	II	0,540	13,2	14,5	0,640
1	B.M. Verschlußikterus	II	0,600	14,4	12,8	0,570
1	D.P. Hepatitis epid.	II	0,550	13,4	13,8	0,610
1	S.O. Leberzirrhose	II	0,785	19,1	21,9	0,950
2	F.N. Magentumor	II	0,890	23,3	23,1	1,000
2	S.N. chron.Hepatitis + Zirrhose	II	0,740	17,9	19,8	0,860
2	S.N. Hepatitis epid. + Zirrhose	II	0,555	13,5	15,0	0,660
3	H.N. Verschlußikterus Cholecystopathie	II	0,550	13,3	15,0	0,660
5	L.F. Zustand nach Magenresektion (Ca)	II	0,470	11,7	11,2	0,500
3	W.M. Verschlußikterus	II	0,260	8,3	8,6	0,395
2	K.N. Bronchial-Ca mit Lebermetastasen	II	0,590	3x14,2 42,6	46,0	1,950
1	K.M. Leberzirrhose	II	0,305	9,0	8,3	0,377
5	H.H. Prostata-Ca met.	II	0,540	13,1	12,6	0,560
4	W.K. Diabetes, Ikterus	II	0,582	14,1	14,9	0,655
1	M.A. Hepatitis	II	0,315	9,2	8,5	0,390

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BoBE	Ext.
5	F.E. Verschlußikterus	II	0,410	10,7	10,0	0,450
4	S.A. Osteochondrose	II	0,505	12,4	13,8	0,610
1	R.J. Bronchial-Ca	II	0,285	8,7	9,8	0,445
1	D.N.	II	0,525	12,8	12,4	0,550
4	S.J. Prostatahypertr. Pyelonephritis	II	0,325	9,4	8,9	0,405
1	W.N. Mamma-Ca	II	0,550	13,3	13,6	0,600
1	K.N. Hepatitis	II	0,510	12,5	12,3	0,545
1	M.T. Leberzirrhose	I	0,590	13,3	15,6	0,685
1	K.K. Hepatopathie	I	0,780	17,4	15,2	0,670
5	K.F. oper.Verschluß- ikterus	I	1,070	25,4	22,4	0,970
1	N.J. Leberzirrhose	I	0,562	12,7	16,1	0,705
1	W.F. Hepatitis	I	0,655	14,5	17,3	0,755
1	M.N. chron.Rheuma- tismus	I	0,720	16,0	12,3	0,545
1	W.N. Hepatitis	I	0,605	13,5	10,6	0,475
1	H.A. Polycythämie	II	0,365	10,0	14,3	0,630
4	H.W. Verschlußikterus	II	0,500	12,3	10,4	0,470
1	V.L. Melanosarkom	II	0,660	15,7	14,3	0,630

Alkalische Phosphatase Gruppe IV (22 BE)

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BoBE	Ext.
1	M.S. Leberzirrhose	I	0,700	15,5	15,5	0,682
2	P.F. met. Mamma-Ca	II	0,345	3x9,7 29,1	31,5	1,35
1	S.G. Leberzirrhose	II	0,970	28,4	28,0	1,200
1	S.N. Leberzirrhose	II	0,740	17,8	17,2	0,750
2	G.N. met. Blasenpap.	II	0,890	3x23,3 69,9	71,2	3,000
3	J.F. Verschlußikterus	II	0,748	3x18 54,0	56,0	1,2000
3	K.N. Gallenkoliken	II	0,535	3x13 39,0	36,3	1,550
1	K.E. cholang. Leber- zirrhose	II	0,820	20,4	22,1	0,955
1	S.K. M.Hodgkin Lebertumor	II	0,336	3x9,5 28,5	29,1	1,250
5	W.A. Genital-Ca	II	0,245	3x8 24,0	22,0	0,950
1	H.N.	II	0,340	3x9,6 28,8	28,4	1,220
4	E.A. Lebercirrhose Cholelithiasis	II	0,465	3x11,6 34,8	35,1	1,500
5	H.F. Blasen-Ca	II	0,325	3x9,4 28,2	30,4	1,300
5	H.W. Hypernephrom	II	0,402	10,7	12,6	0,560
1	M.A. M.Hodgkin	II	0,740	17,9	17,9	0,780

H	Patient/Diagnose	Q	Ext.	BE	BoBE	Ext.
1	H.H. prim. Gallengangs- Ca mit Lungenmet.	II	0,560	3x13,5 40,5	40,0	1,700
1	K.V. Verschlußikterus	II	0,910	24,2	31,5	1,350
1	P.E. Verd. auf Myelom	I	0,960	23,3	26,0	1,120
4	W.K. Verschlußikterus	II	0,750	18,2	23,0	1,000

Verteilung der Fälle auf die einzelnen Gruppen in BE:

BE	Gruppe I (3 BE)	Gruppe II (6 BE)	Gruppe III (12 BE)	Gruppe IV (22 BE)
0, - 1,4				
1,5- 2,4	3			
2,5- 3,4	15			
3,5- 4,4	8	3		
4,5- 5,4	7	5		
5,5- 6,4	5	17		
6,5- 7,4	2	13		
7,5- 8,4	1	9	1	
8,5- 9,4		8	4	
9,5-10,4	1	6	2	
10,5-11,4		8	1	1
11,5-12,4		1	5	
12,5-13,4		2	11	
13,5-14,4			5	
14,5-15,4			3	
15,5-16,4			4	1
16,5-17,4			3	
17,5-18,4		1	1	3
18,5-19,4			1	
19,5-20,4				1
20,5-21,4			1	
21,5-22,4				
22,5-23,4			1	1
23,5-24,4				2
24,5-25,4			1	
25,5-26,4				
26,5-27,4				
27,5-28,4				2
28,5-29,4				3
.....				
34,8				1
39,0				1
40,5				1
42,6			1	
44,7			1	
54,0				1
69,9				1
180 Fälle:	42	73	46	19

In der zuletzt angeführten Tabelle ist die Variationsbreite der tatsächlichen Werte in den Gruppen wiedergegeben. Dabei wurde als Richtwert nur der BE-Wert der Phosphatabs-Methode berücksichtigt, um einen durch geringe Substratspezifität und Umrechnung von mMole auf BE entstandenen Fehler der zweiten Methode auszuschließen. Noch besser läßt sich das Ergebnis durch eine graphische Darstellung veranschaulichen: (siehe folgende Seite).

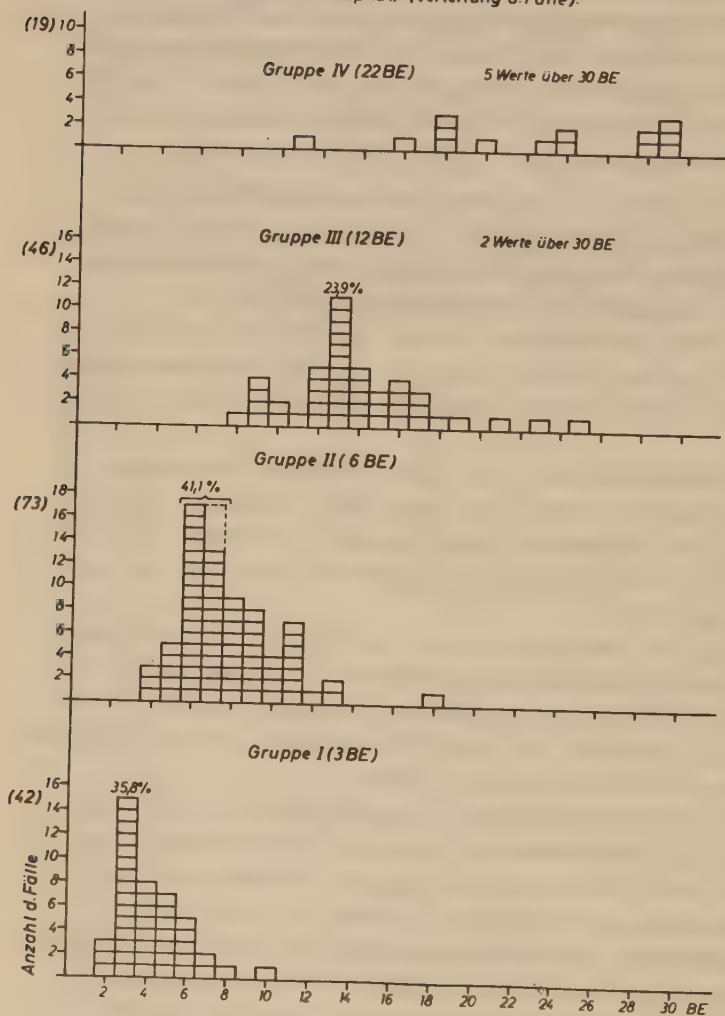
Auf Grund der Tabelle und graphischen Darstellung lassen sich einige Aussagen über die durch den Schnelltest erfolgte Klassifizierung der untersuchten Seren machen: Gruppe I: Bei einer Variationsbreite von 9 BE (1,5 - 10,4 BE) liegt das Maximum (35,8%) der Fälle zwischen 2,5 und 3,4 BE; einem steilen Anstieg von den niedrigen Werten zum Gipfel folgt nur ein langsamer Abfall bei den höheren Werten.

Gruppe II: Hier beträgt, von einer Ausnahme abgesehen, die Variationsbreite 10 BE (3,5 - 13,4 BE); wiederum folgt einem steilen Anstieg zu einem breiteren Maximum (41,1 %) zwischen 5,5 und 7,4 BE ein langsames Absinken zu den höheren Werten hin.

Gruppe III: Die Variationsbreite ist auf 18 BE angestiegen (zwei Fälle fallen mit extremen Werten aus dem Rahmen); der verhältnismäßig kurze Anstieg zu einem deutlichen Maximum (23,9 %) bei 12,5 bis 13,4 BE geht in einen langen Abfall der "Verteilungskurve" über.

Gruppe IV: Mit Rücksicht auf die geringe Zahl der Fälle ist hier eine Interpretation des optischen Erscheinungsbildes nur mit Zurückhaltung möglich. Während ein deutlicher Häufungspunkt nicht zu finden ist, kann man jedoch feststellen, daß alle gefundenen Werte eindeutig über dem Maximum der Gruppe III liegen und daß eine gewisse Konzentration im Bereich zwischen 17,5 und 30 BE auffällt. Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß die Gruppen I bis IV mit abnehmender Genauigkeit ein Maximum aufweisen,

Alkalische Phosphat. (Verteilung d. Fälle).



welches bei jeder Gruppe im Bereich des ihr eigenen Definitions punktes liegt. Außerdem erscheint bei wachsender Variationsbreite der niedrigste Wert einer Gruppe über dem Gipfel der vorhergehenden.

3.) Diskussion

Saure Phosphatase

Wenn auch ein Vergleich der quantitativen Phosphatabs-Methode mit einer entsprechenden anderen Methode auf Grund der erwähnten Unterschiede keine befriedigenden Ergebnisse erkennen läßt, so trifft das nicht für den Vergleich mit dem Phosphatabs-Schnelltest zu. Vielmehr zeigen die Versuche, daß ein Serum der Gruppe I (0,6 BE) sich auch mit der vollquantitativen Phosphatabs-Methode diesem Bereich zuordnen läßt. Lediglich bei Gruppe II (1,0 BE) und III (über 2,5 BE) sind die Grenzen nicht klar zu ziehen. Damit aber wird die Bedeutung des Schnelltestes klar umrissen: er gestattet, in kürzester Zeit unter dem geringsten Material- und Arbeitsaufwand die Frage zu entscheiden, ob ein Serum in bezug auf die saure Phosphatase normal ist oder eine pathologische Erhöhung aufweist. Zeigt er die Zugehörigkeit eines Serums zu einer Gruppe mit erhöhten Werten an, so sollte in jedem Fall eine vollquantitative Bestimmung angeschlossen werden. Ein weiterer Vorteil der Phosphatabs-Acid-Methode liegt in der Verwendung des Substrates α -Naphthylphosphat, das gegenüber anderen Substraten die bei weitem größte Spezifität für die saure Prostata-Phosphatase besitzt (10). Da die klinische Bedeutung der sauren Serumphosphatase-Bestimmung hauptsächlich darin liegt, einen krankhaften, besonders malignen Prozeß in der Prostata eines Patienten auszuschließen oder unterstützend zu verifizieren, und da man heute ein Auftreten dieses Enzyms im Serum nur unter pathologischen Bedingungen vermutet (5), gibt die hier verwandte Methode die zuverlässigste Auskunft und muß von diesem

Standpunkt aus Methoden mit anderen Substraten vorgezogen werden. Schließlich hat sich bei einer säulen-chromatographischen Untersuchung eines Serums mit extrem hoher saurer Phosphatase-Aktivität gezeigt, daß nach einer durch die Dauer der Untersuchung bedingten Karenz von 24 bis 48 Stunden bei Zimmertemperatur sich nur mit Hilfe der vollquantitativen Phosphatabs-Methode in einzelnen Fraktionen stark erhöhte Werte nachweisen ließen. Die zum Vergleich herangezogene Methode mit dem Substrat p-Nitrophenylphosphat (Boehringer) erwies sich hierzu als nicht anwendbar.

Alkalische Phosphatase

Der Phosphatabs-Schnelltest läßt für die ersten drei Gruppen (3-6-12 BE) eine gute Unterscheidbarkeit erkennen, während beim Übergang zur vierten Gruppe (22 BE) die Grenzen unklar erscheinen. Seine besondere Bedeutung liegt darin begründet, daß er mit der Einstufung eines Serums in die Gruppe I (3 BE) den Schluß erlaubt, daß seine alkalische Phosphatase-Aktivität im Normbereich liegt, allenfalls schwach darüber. Bei Zugehörigkeit zu den Gruppen II und III (6 bzw. 12 BE) ist eine Erhöhung der Enzymaktivität mit Sicherheit anzunehmen und schon in einen bestimmten Bereich mit Annäherung an ein Maximum zu verweisen. Ein Serum aus Gruppe IV besitzt auf jeden Fall einen stark erhöhten Aktivitätswert. Seine tatsächliche Größe ist aber nicht sicher festzulegen. In allen Fällen mit erhöhten Aktivitätswerten empfiehlt sich deshalb im Anschluß eine vollquantitative Bestimmung.

Es bleibt noch zu erwähnen, daß bei der Prüfung des Einflusses von Serum-pH-Schwankungen auf die Stabilität des Puffers verschiedener Methoden sich der Phosphatabs-Alkaline-Puffer (Methode KLEIN u.a.) durch die geringste Variabilität ausgezeichnet hat.(23).

Der große Vorteil beider Phosphatabs-Schnelltests zur Bestimmung der sauren und alkalischen Serumphosphatasen be-

steht somit in der Möglichkeit, mit Hilfe derselben Reagenzien auch eine vollquantitative Bestimmung durchzuführen. Beide Methoden haben sich in unseren Versuchen als brauchbar erwiesen.

Es bietet sich nun eine ideale Kombination der halbquantitativen Schnell- mit der vollquantitativen Normalmethode an: Das Gros der in einem Routine-Labor anfallenden Seren dürfte sich durch den Schnelltest als normal bestätigen lassen. Die Seren mit erhöhten Aktivitätswerten aber können in einem zweiten Arbeitsgang mit Hilfe der vollquantitativen Bestimmungsmethode eindeutig und genau festgelegt werden.

b) VERSATOL als Kontroll- bzw. Standardserum

Zur Überprüfung der Aktivitätsangaben mit Hilfe der p-Nitrophenol-, α -Naphthyl-Phosphat- und Phenolphthaleinphosphat-Methode verwandten wir in einer nachfolgenden Untersuchungsreihe die Kontrollsera Versatol-E und Versatol-Pediatric aus der Reihe des Versatol-Standardserum-Systems (Versatol ist ein Produkt der General Diagnostics Division, Warner Chilcott, Morris Plains, zu beziehen über die Firma Goedecke, Memmingen).

Beim Versatol-E handelt es sich um ein gesammeltes menschliches Standardserum mit klinisch erhöhten Werten für häufig untersuchte Serumenzyme: alkalische und saure phosphatase, Amylase, Lipase, Glutamin-Oxalat-Transaminase und Lactat-Dehydrogenase.

Versatol-Pediatric wird den Bedingungen für ein Kinder-Standard-Serum gerecht und enthält auch normale Elektrophorese-Werte. Hier interessiert uns aber nur ein Standardwert für die alkalische Serumphosphatase.

Einer der Standardserum-Packung beigegeführten Tabelle lassen sich die genauen Aktivitätswerte für die üblichen Bestimmungsmethoden entnehmen. Die Schwierigkeit einer Standardisierung solcher Seren bringt es mit sich, daß diese Werte immer nur für die in einer Packung befindlichen Serumfläschchen gelten, aber von den Werten einer anderen Packung verschieden sind. Voraussetzung für die Genauigkeit der Werte ist, daß man die in einem Fläschchen befindliche Trockensubstanz mit der angegebenen Menge dest. Wasser genau verdünnt.

1.) Versuchsergebnisse

α) saure Phosphatase

Das Enzym ist nur im Versatol-E und dort als rein phosphatisches Isoenzym enthalten.

Der beigegeführten Tabelle entnehmen wir folgenden Wert für die Naphthylphosphat-Methode nach BABSON-READ (Phospha-

tabs-Acid Quantitative II): 34,5 BRE (Babson-Read-Einheiten). Laut Vorschrift für die Phosphatabs-Methode kann man die BRE durch Multiplikation mit dem Faktor 0,18 in Bodansky-Einheiten umwandeln; wir erhalten somit:

$34,5 \cdot 0,18 = 6,21$ BE. Als zulässige Abweichung betrachten wir $\pm 10\%$, also

Standardwert $6,21 \pm 0,6$ BE

Mit der Babson-Read-Methode ergaben sich bei 6 Bestimmungen folgende Werte: (Extinktion)

0,665 Durch Einsetzen des arithmetischen Mittelwertes
0,700 in die für die Methode ermittelte Gleichung er-
0,665 halten wir:
0,660
0,660 $0,672 \cdot 10,3 - 0,52 = \underline{6,4 \text{ BE}}$
0,680
 $4,030 : 6 = \underline{0,672}$

Die p-Nitrophenyl-Methode nach ANDERSCH (Boehringer) wird zwar auf der Tabelle nicht genannt. Da wir jedoch beide Methoden auf BE umgerechnet haben, ist ein Vergleich möglich.

Wir erhielten folgende Extinktionswerte:

0,680 Setzt man den Mittelwert in die für die Methode
0,680 verbindliche Gleichung ein, erhält man:
0,700
0,690 $0,683 \cdot 10,23 = 1,3 (\pm 0,655)$
0,670 $= \underline{5,7 (\pm 0,655) \text{ BE}}$
0,675
 $4,095 : 6 = \underline{0,683}$

Beide Werte liegen innerhalb der zulässigen Abweichung und lassen sich als Bestätigung für die Genauigkeit der Methode und ihrer Durchführung betrachten.

β) alkalische Phosphatase

Versatol-E:

Für die von uns verwandten Methoden sind folgende Werte angegeben:

Klein-Babson-Read (Phosphatabs-Alkaline Quantitative II) 18 KBRE (Klein-Babson-Read-Einheiten). Mit Hilfe der Konversionstafel für Phosphatabs-Alk. Quant.II findet man den

entsprechenden BE-Wert: 18 KBRE $\hat{=}$ 14,5 BE. Unter Berücksichtigung der zulässigen $\pm$ 10% Abweichung erhalten wir:

Standardwert: 14,5 $\pm$ 1,5 BE

Bessey-Lowry-Brock (p-Nitrophenyl-Methode, Boehringer) 6,2 mMolE. Mit Hilfe der Südhofschens Transformationsgleichung ergibt sich: 6,2 mMolE $\hat{=}$ 2 $\cdot$ 6,2 - 0,8 = 11,6 BE. Aufgrund der guten Erfahrungen mit der Südhofschens Formel und der folgenden Versuchsergebnisse erscheint uns der angegebene Wert von 6,2 mMolE zu niedrig. Wir schlagen hingegen einen Wert vor, den wir mit der Südhofschens Formel erhalten, wenn wir vom Wert 14,5 BE (siehe vorige Methode) auf mMolE rückschließen:

$$14,5 \text{ BE} \hat{=} 0,5 \cdot 14,5 + 0,4 = \underline{7,7 \text{ mMolE}}$$

Standardwert: 7,7 mMolE (Abw. $\pm$ 0,8 mMolE)

Mit der Klein-Babson-Read-Methode (Phosphatabs-Alk.Qu.II) erhielten wir als Extinktionswerte:

0,595	Dem Extinktionsmittelwert von 0,581 entspricht
0,580	nach unserem Diagramm (Nr.6) eine alk. Phospha-
0,570	tase-Aktivität von <u>14,0 BE</u>
0,550	
0,600	
0,590	
<u>3,485</u>	: 6 = <u>0,581</u>

Die Bessey-Lowry-Brock-Methode (Boehringer) ergab folgende Extinktionswerte:

0,650	Mit Hilfe des Diagramms (Nr.3) erhalten wir
0,650	nach der Formel $y = 24x - 0,8$:
0,655	
0,670	0,655 $\cdot$ 24 - 0,8 = <u>14,9 BE</u>
0,650	
0,655	
<u>3,930</u>	: 6 = <u>0,655</u>

Versatol Pediatric:

Die angegebenen Werte für unsere Methoden betragen:

Klein-Babson-Read (Phenolphthaleinphosphnat, Phosphatabs-Alkaline Quantitative II): 7,4 KBRE. Nach der Konversions-

tafel entspricht das einem BE-Wert von 7,7. Unter Berücksichtigung der hier zulässigen $\pm 5\%$ -Abweichung ergibt sich ein Wert von $7,7 \pm 0,4$ BE (Standardwert).

Die p-Nitrophenyl-Methode (Bessey-Lowry-Brock, Boehringer) muß einen Wert von 4,1 mMolE ergeben; mit Hilfe der Südhofschens Transformationsgleichung errechnet sich:

$$4,1 \cdot 2 - 0,8 = \underline{7,4 \text{ BE}} \text{ (Standardwert)}$$

Die Phenolphthalein-Methode (Phosphatbs-Alk. Qu.II) ergab folgende Extinktionswerte:

0,225 Nach unserem Diagramm (Nr.6) entspricht dem Mittelwert von 0,230 eine Aktivität von 7,7 BE.
 0,235
 0,227
 0,235
 0,230
 0,225
1,377 : 6 = 0,230

Die p-Nitrophenyl-Methode (Boehringer) erbrachte die Extinktionswerte:

0,328
 0,320
 0,324
 0,319
 0,330
 0,315
1,936 : 6 = 0,323

Gemäß unserem Diagramm (Nr.3) ist der zum Extinktionsmittelwert von 0,323 zugehörige Aktivitätswert der alkalischen Phosphatase 7,0 BE. In bezug auf den ermittelten Wert von 7,4 (Standard) wird die $\pm 5\%$ -Abweichung noch eingehalten.

Sämtliche Versuchswerte liegen somit im Bereich der zulässigen Abweichungen. Arbeitsmethoden und ihre Ausführung erhalten dadurch eine unterstützende Aussage über ihre Zuverlässigkeit.

2.) Ergänzende Bemerkungen und Diskussion

(α) Stabilität

Versatol-E und Versatol Pediatric sind im trockenen Zustand bei +5°C unbegrenzt haltbar. Die gebrauchsfertigen Lösungen bleiben nur über zwei Arbeitstage stabil.

Bemerkenswert ist, daß die saure prostatistische Phosphatase im Versatol-E, die normalerweise im menschlichen Serum nur wenige Stunden haltbar ist, eine ganze Woche in der gebrauchsfertigen Lösung stabil bleiben soll; durch eine besondere Behandlung hat man das CO₂ aus dem gesammelten Serum zur Versatol-Zubereitung gezogen. Der pH-Wert bleibt deshalb nach Auflösung der Trockensubstanz konstant, wohingegen er in einem frischen Serum gemäß seiner CO₂-Abnahme schnell ansteigt und das Enzym inaktiviert.

(β) Berechnungsformel

In unseren Versuchen benutzten wir Versatol als Kontrollserum. Bei Routine-Untersuchungen empfiehlt es sich, bei jedem Arbeitstag einen Versatol-Standard mitlaufen zu lassen. Laut Bedienungsanleitung läßt sich dann die unbekannte Aktivität in einem Patientenserum mit Hilfe der Standardwerte nach folgender Beziehung berechnen:

$$\frac{\text{o.D. Pat.}}{\text{o.D. Standard}} \cdot \text{Versatol-E-Aktivität} = \text{Aktivität d. Patientenserums}$$

Die Formel drückt eine lineare Beziehung aus. Das heißt aber, daß die so ermittelten Werte nur dann Gültigkeit besitzen, wenn die Beziehung optische Dichte:Aktivitäts-Einheit für die angewandten Methoden linear ist. Weiterhin ist in der Formel für o.D. Pat. = 0 auch die Aktivität des Patientenserums gleich Null. Das bedeutet, daß die graphische Darstellung der Beziehungsformel eine Gerade ist, die durch den Nullpunkt und den jeweiligen Standardpunkt eines rechtwinkligen Koordinatensystems mit den Koordinaten x(Extinktion) und y (Aktivitäts-Einheit) geht. Von dieser Geraden weichen aber alle graphischen Dar-

stellungen, die die Beziehung zwischen Extinktion und Bodansky-Einheiten (BE) in den von uns verwandten Methoden wiedergeben, ab. Die auffälligste Abweichung zeigt sich für die alkalische Phosphatase nach der Klein-Babson-Read-Methode (Phosphatabs-Alk. Qu.II), da hier die Beziehung durch eine S-Kurve graphisch ausgedrückt wird. Die lineare Beziehungsgleichung, wie sie in der Begleitschrift der Versatol-E und - Pediatric angegeben wird, entspricht also nicht den individuellen Unterschieden der Bezugsgeraden oder -kurven der von uns verwandten Methoden. Eine solche Vereinfachung der Berechnung unbekannter Aktivitätswerte bleibt immer ungenau und führt nicht zum Ausgleich der in einem Arbeitsgang entstandenen Fehlabweichungen.

8) Berücksichtigung der Standardabweichung

Die Aufgabe eines Standardserums liegt allein darin, mögliche Fehler, die sich im Laufe eines Untersuchungs-gangs eingeschlichen haben, aufzudecken und sie zu korrigieren, wenn sie innerhalb einer Grenze geblieben sind. Dabei ist es aber unerlässlich, an der für eine Methode verbindlichen Bezugsgeraden oder -kurve festzuhalten. Ein Maß für die Tauglichkeit von Methode und Durchführung ist die Kontrollprüfung mit dem Standardserum durch eine Versuchsreihe. Stimmt der mit der Methode ermittelte Aktivitätswert des Kontrollserums mit dem geforderten Wert überein oder beträgt die Abweichung davon nicht mehr als die zulässige Differenz von $\pm 10\%$ (Versatol-E) bzw. $\pm 5\%$ (Versatol Pediatric), so sind Methode und ihre Durchführung befriedigend. Wird der zulässige Grenzwert überschritten, ist die Methode bzw. meistens ihre Durchführung ungenau. Man sollte dann solange nach Fehlerquellen forschen, bis ein geforderter Mindestwert erreicht wird.

Dadurch wird die Aufgabe eines Standardserums klar umrissen. Es handelt sich nur darum, eine zulässige Grenzab-

weichung von einem "Idealpunkt" für die anderen Werte korrigierend zu berücksichtigen. Der "Idealpunkt" wird nur dann erreicht, wenn man mit der Methode für den betreffenden Arbeitsgang den genauen Standard-Aktivitätswert erhält, d.H. wenn die gemessene Extinktion mit dem Extinktionswert, der auf der verbindlichen Bezugsgeraden oder -kurve der Methode dem Standard-Aktivitätswert entspricht, übereinstimmt. In diesem Falle ist eine Korrektur überflüssig.

Meistens jedoch wird der gemessene Extinktionswert vom Idealwert abweichen. Bleibt die Abweichung in den oben genannten Grenzen, dann kann man im Sinne einer Interpolation eine Korrektur an den Aktivitätswerten der Patientenserum, wie sie mit der Methode ermittelt wurden, vornehmen. Nur für die zulässige Abweichung gilt dann die lineare Beziehung. Im einzelnen ergibt sich:

αα) saure Phosphatase: Versatol-E-Standard: $6,21 \pm 0,6$ BE
Babson-Read (Phosphatase-Acid Qu. II)

Idealpunkt: 6,21 Ext. 0,653

zul. Abweichung: $\pm 10\% = \pm 0,6$ BE Ext. 0,594 - 0,711

Beispiel: In einem Arbeitsgang beträgt der Extinktionswert für das Standardserum 0,600, liegt also innerhalb der zulässigen Abweichung. Man erhält folgende lineare Beziehung:

$$\frac{0,600}{0,653} = \frac{x}{6,21} \quad \underline{x = 5,71}$$

Der Quotient aus dem idealen Standardextinktionswert und dem gefundenen Standardextinktionswert ergibt einen Faktor, mit dem man die mit der Methode ermittelten Aktivitätswerte desselben Arbeitsgangs korrigierend multiplizieren muß. In unserem Fall liegt die gemessene Extinktion unter dem idealen Wert. Infolgedessen liegen auch die Extinktionswerte der Patientenserum dieses Arbeitsgangs niedriger und ergeben mit der Methode einen niedrigeren Aktivitätswert. Zur Korrektur muß man sie mit einem Faktor multiplizieren, der größer als eins ist. Man erhält ihn aus der vorgeschlagenen Beziehungsgleichung:

$$\frac{0,653}{0,600} = \frac{6,21}{5,71} = \underline{\underline{1,09}}$$

Vereinfachend zeigt sich, daß der Faktor gleich dem Quotienten aus dem Idealextinktionswert für das Standardserum und der jeweils gemessenen zulässigen Standard-Extinktion ist:

$$\frac{\text{ideale Extinktion}_{\text{Standard}}}{\text{gemessene Extinktion}_{\text{Standard}}} = f$$

Für das jeweilige Serum eines Arbeitsgangs erhält man den korrigierten Aktivitätswert durch Multiplikation des ermittelten Aktivitätswertes mit dem Faktor f:

korrig. Aktivitätswert = f · gemessener Aktivitätswert.

Für die anderen Methoden gilt das oben Gesagte:

p-Nitrophenol-Methode (ANDERSCH, Boehringer)

Idealpunkt: 6,21 BE Ext. 0,734

zulässige Abweichung: ± 0,6 BE Ext.: 0,674 - 0,792

β) alkalische Phosphatase

Klein-Babson-Read (Phosphatabs-Alk. Qu.II)

Versatol-E:

Idealpunkt: 14,5 BE Ext.: 0,602

zul. Abw.: ± 1,5 BE Ext.: 0,532 - 0,668

Versatol Pediatric:

Idealpunkt: 7,7 BE Ext.: 0,230

zul. Abw.: ± 0,4 BE Ext.: 0,212 - 0,255

p-Nitrophenol-Methode (Bessey-Lowry-Brock, boehringer)

Versatol-E:

Idealpunkt: 14,5 BE Ext.: 0,638

zul. Abw.: ± 1,5 BE Ext.: 0,575 - 0,698

Versatol Pediatric:

Idealpunkt: 7,4 BE Ext.: 0,343

zul. Abw.: ± 0,4 BE Ext.: 0,325 - 0,360

c) Chromatographische Lokalisation der Serum-
phosphatasen

Zum Abschluß unserer experimentellen Untersuchungen beschäftigen wir uns kurz mit der Frage, in welchen chromatographischen Eiweißgruppen die Serumphosphatasen auftreten.

1.) Fremduntersuchungen

Die uns zugänglichen elektrophoretischen Untersuchungsarbeiten behandeln nur die Frage der Lokalisation der alkalischen Serumphosphatase. Sie wird in den Banden der α_2 - und β -Globulin-Fraktion gefunden. Der Aktivitätsgipfel soll hauptsächlich der α_2 -Fraktion zufallen, während ein geringerer Prozentsatz in der β -Globulin-, manchmal auch in der α_1 -Fraktion auftaucht (38). Bei Lebererkrankungen hat man eine sehr schnell wandernde, vor den Albuminen laufende Fraktion mit hoher Phosphatase-Aktivität nachgewiesen. Sie soll 15-20% der Gesamtaktivität ausmachen. (37).

Weitere Untersuchungen lassen differential-diagnostische Schlüsse auf bestimmte Leber- und Knochenerkrankungen zu (39). Danach soll bei Lebererkrankungen die alkalische Phosphatase-Aktivität der α_2 -Fraktion erhöht sein, weniger in der α_1 - und überhaupt nicht in der β -Fraktion. Die Ostitis deformans Paget bringt ihre Erhöhung in der β - und α_2 -, nicht jedoch in der α_1 -Fraktion.

Carcinom-Metastasen äußern sich in einer mäßigen Erhöhung der α_2 -alk.-Phosphatasen-Fraktion, während der β - und α_1 -Anteil normal bleibt. Die Lebermetastasen bewirken eine deutliche Erhöhung des α_2 - und einen mäßigen Anstieg des α_1 -Anteils. Bei Knochenmetastasen ist der β -Anteil um mehr als 50% gesteigert.

Demnach ergeben sich bei Krebserkrankungen folgende Charakteristika:

1. Das Verhalten des α_2 -Anteils der alkalischen Phosphatase trennt die Gruppe der Tumoren ohne und mit Metastasen.

2. Das Verhalten der α_1 -alk.-Phosphatase-Fraktion trennt die Gruppe von Tumoren mit und ohne Lebermetastasen.

3. Das Verhalten des β -Anteils trennt die Gruppe der Tumoren in solche mit und ohne Knochenmetastasen.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderer Seite beschrieben (40).

Säulenchromatographische Untersuchungen zur Lokalisation der alkalischen und sauren Serumphosphatasen wurden von amerikanischen Forschern durchgeführt (41).

Daraus geht klar hervor, daß die saure und alkalische Phosphatase in verschiedenen Fraktionen lokalisiert sind.

2.) Eigenuntersuchungen

α) Methodik

Säulenchromatographie

Wir benutzten eine Modifizierung der von SOBER und PETERSON angegebenen Methode (41,42).

Als Anionenaustauscher dient Diaethyl-Amino-Aethyl-Cellulose (DEAE). Das Elutionssystem besteht aus 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 8 und 0,3 M primärem Natriumphosphatpuffer pH 4,5, die im Volumenverhältnis 2:1 über eine kommunizierende Röhre hintereinandergeschaltet sind.

Die Elution der Serumproteine vollzieht sich über einen kontinuierlichen Anstieg der Molarität und einen Abfall des pH-Gradienten, d.h. mit steigender Elutionskraft. Die Flußgeschwindigkeit des Eluats (Durchflußrate) betrug in unseren Versuchen 15 ml/h. Ein vollautomatischer Fraktionssammler teilte die Fraktionen in 4 ml-Portionen pro Reagensglas auf.

Vor Auftragen des Serums auf die Säule wurde es noch gegen ein 15- bis 30-faches Volumen von 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 8 für die Dauer von einigen Stunden dialysiert. Die folgende Tabelle gibt Aufschluß über die bei unseren Versuchen benutzten Säulen mit den ihnen zugehörigen

Puffer-, Adsorbans- und Serummengen:

Vers.	Säule Länge : Ø cm	Puffer I 0,01 M Na-phos phatpuffer pH 8	Puffer II 0,3M prim. Na-phosph. pufferpH4,5	Adsorbans DEAE- Zellulose	Ser.
I+II saure Phos- phata se	22: 1,5	ca.200 ml	ca.100 ml	ca.10gr.	2 ml
III alk. Phos- phat.	30: 1,7	ca.500 ml	ca.250 ml	ca.15gr.	4ml

Als Maß der Eiweißkonzentration wurde in den einzelnen Fraktionen die optische Dichte bei $280\text{ m}\mu$ (D 280) mit Hilfe des PMQ II Zeiss-Photometers bestimmt. In einer graphischen Darstellung wurde der Konzentrationsgradient als optische Dichte (Ordinate) gegen die Röhrchenfraktionen fortlaufend aufgetragen. Daneben erfolgte auch eine kontinuierliche pH-Messung.

Vor der Phosphatase-Aktivitäts-Bestimmung wurden die einzelnen Röhrchenfraktionen in den intermaximalen Bereichen zusammengefaßt, alle jedoch danach bis auf 1ccm eingengt. Die Konzentrierung erfolgte mit Carbowax (Polyäthylen-Glycoll, Mg 20 000) in Cellophan-Dialyserschläuchen von 15 mm Durchmesser bei 4°C .

Zur Eliminierung des Phosphatpuffers wurde im Versuch III abschließend noch eine ausgedehnte Dialyse über 12 Stunden gegen eine Lösung von 0,05 M Natriumacetat und 0,1 M Natriumchlorid angeschlossen.

Bei Normalseren erscheinen die einzelnen Eiweißfraktionen in folgender Sequenz:

1. Peak: γ -Globuline
2. Peak: hauptsächlich β -Globuline, vermischt mit einem geringen Anteil γ -Globulinen.
3. Peak: Albumine

Die α_1 - und α_2 -Fraktionen erscheinen an verschiedenen Stellen und werden immer mit Beimengungen von Albuminen gefunden.

Papierelektrophorese-Messung

wir arbeiteten nach dem Standardverfahren von GRASSMANN und HANNIG (43). Dabei wurde der Papierstreifen in vier Felder von je 2,5 cm Länge eingeteilt. Auf die erste Teilstrecke wurde das Ausgangsserum und auf die folgenden nacheinander die drei verschiedenen chromatographischen Gipfelfraktionen aufgetragen. Als Puffer benutzten wir Veronal-Natrium-Acetat nach MICHAELIS (44) mit einem pH von 8,6 und einer Ionenstärke von $U = 0,1$. Bei einer Spannung von 120 Volt betrug die Trennzeit 14 Stunden (Nähere Einzelheiten 43,45,46).

Phosphatase-Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der sauren und alkalischen Serumphosphatasen erfolgte nach den oben beschriebenen Verfahren (Testcombination Boehringer, Phosphatabs Quantitative).

β) Ergebnisse

Wir untersuchten für die saure und alkalische Phosphatase je ein Serum mit extrem pathologischer Aktivitätserhöhung. Selbstverständlich berechtigen uns diese Versuche nicht zu allgemein gültigen Aussagen. Aber im Zusammenhang mit den bisherigen spärlichen Untersuchungen anderer Forscher passen sie gut zu den beschriebenen Ergebnissen.

Wir geben zunächst die Aktivitätsmessungen in den einzelnen Röhrchenfraktionen der drei Versuche wieder.

Saure Phosphatase:

Versuch I	Patient A.A.	Herkunft: 1
Diagnose: metastasierendes Prostata-Ca		

Röhrchen Nr.	Phosphatabs BE	Qu.II Ext.	Ext.	Boehringer BE
6	0	0,045	0,003	0
48	0	0,040	0,002	0
48/51	0,25	0,075	-	-
52	0	0,040	-	-
56	1,0	0,145	-	-
57	4,53	0,480	-	-
58	1,54	0,200	-	-
59	0,77	0,125	-	-
59/60	0,84	0,132	-	-
61/63	0,41	0,090	-	-
64/70	0,26	0,076	-	-
70/75	0,39	0,088	-	-
75/86	0,22	0,072	-	-
Gesamtserum	14,0	1,400	2,000	20

Versuch II (spätere Untersuchung beim selben Patienten)

Gesamtserum	16,7	2x 0,860	2x 2,000	38,3
4	-	-	-	-
6/8	0	0,005	-	-
9/10	0	0,015	-	-
11/12	0	0,010	-	-
13	0	0	-	-
14/15	0	0,022	-	-
16/18	-	-	-	-
19/20	-	-	-	-
21/24	0	0,042	-	-
25/29	0	0,049	-	-
30/32	0,05	0,055	-	-
33/34	0	0,045	-	-
35/36	0,12	0,062	-	-
37	0,24	0,074	-	-
38	0,13	0,063	-	-
41/42	0,29	0,079	..	-

Röhrchen Nr.	Phosphatabs Qu.II		Ext.	Boehringer BE
	BE	Ext.		
43/44	0,31	0,081	-	-
45/46	0,43	0,092	-	-
47/48	0,31	0,081	-	-
49/50	0,29	0,079	-	-
51/52	0,33	0,082	-	-
53/54	0,33	0,082	-	-
55	0,66	0,114	-	-
56/57	0,41	0,090	-	-
58/59	0,34	0,083	-	-
60/61	0,22	0,072	-	-
62/63	0,17	0,067	-	-
64/65	0,17	0,067	-	-
66/69	0	0,050	-	-
70/71	0,09	0,061	-	-
72/73	0,03	0,053	-	-
74/75	0,01	0,052	-	-
76/77	0	0,046	-	-
78/80	0,04	0,054	-	-
81/85	0,01	0,052	-	-

alkalische Phosphatase:

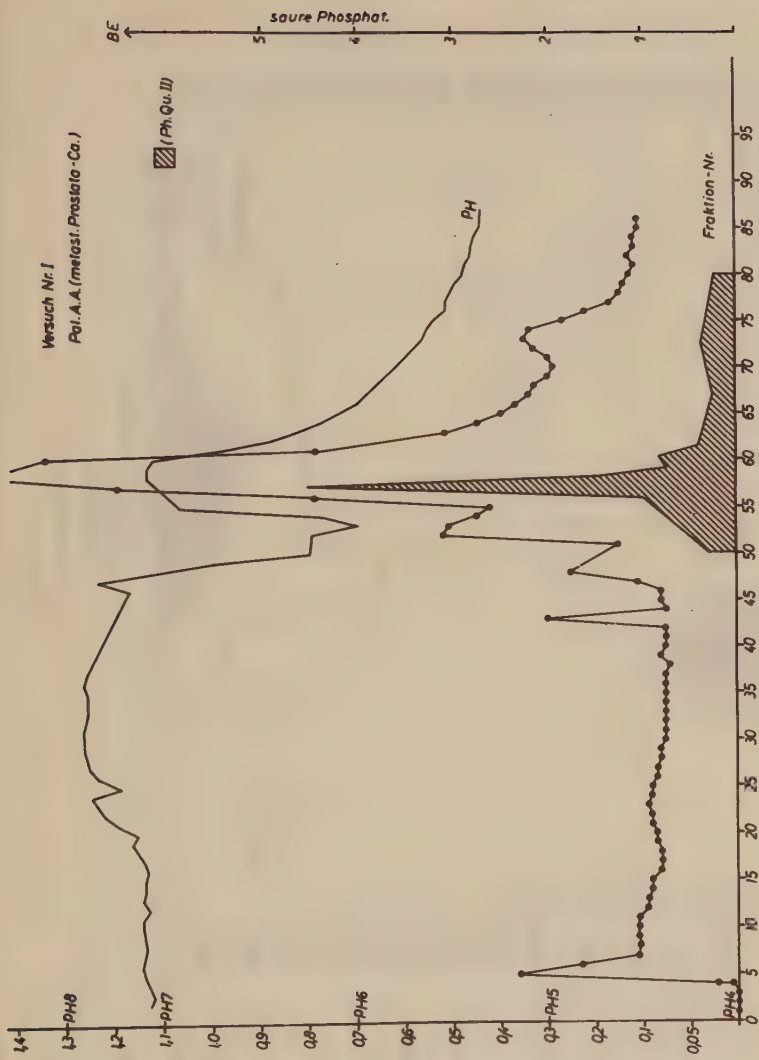
Versuch III Patientin S.E. Herkunft: 1
Diagnose: metastasierendes Mamma-Carcinom

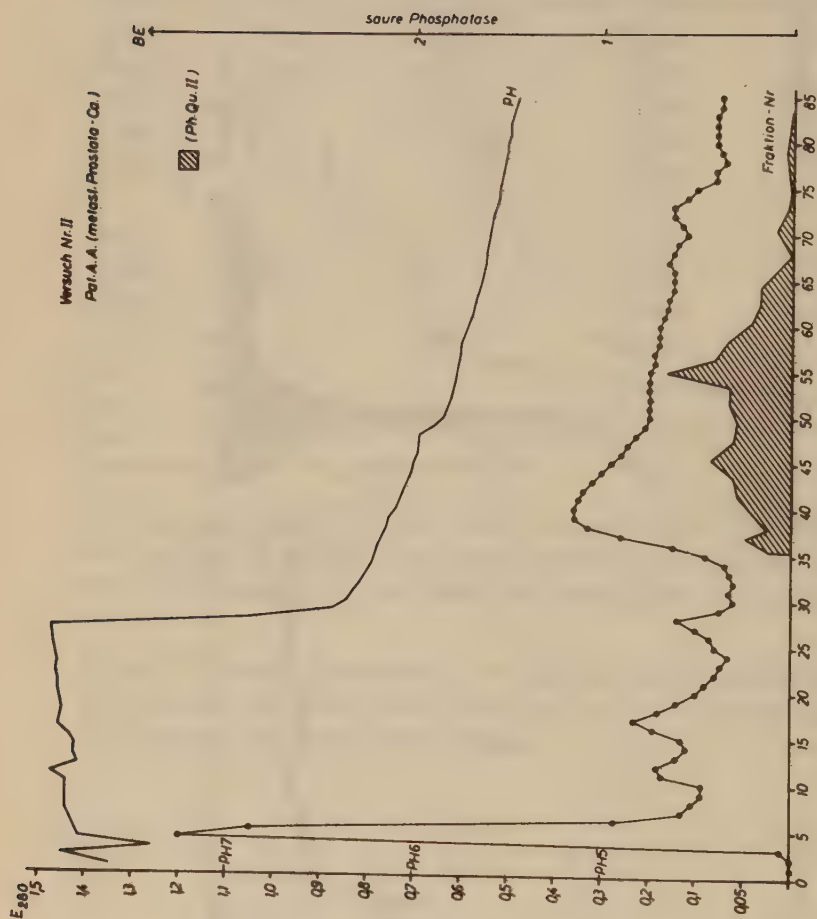
Gesamtserum	71,0	3,000	3x 1,050	90
" dialysiert	85,6	3,600	0,680	49,2
11/15	-	-	-	-
16/24	-	-	-	-
25/30	-	-	-	-
31/35	-	-	-	-
36/40	-	-	-	-
41/43	-	-	0,022	0
44/45	2,6	0,050	0,165	3,2
52/54	6,3	0,157	0,355	7,7

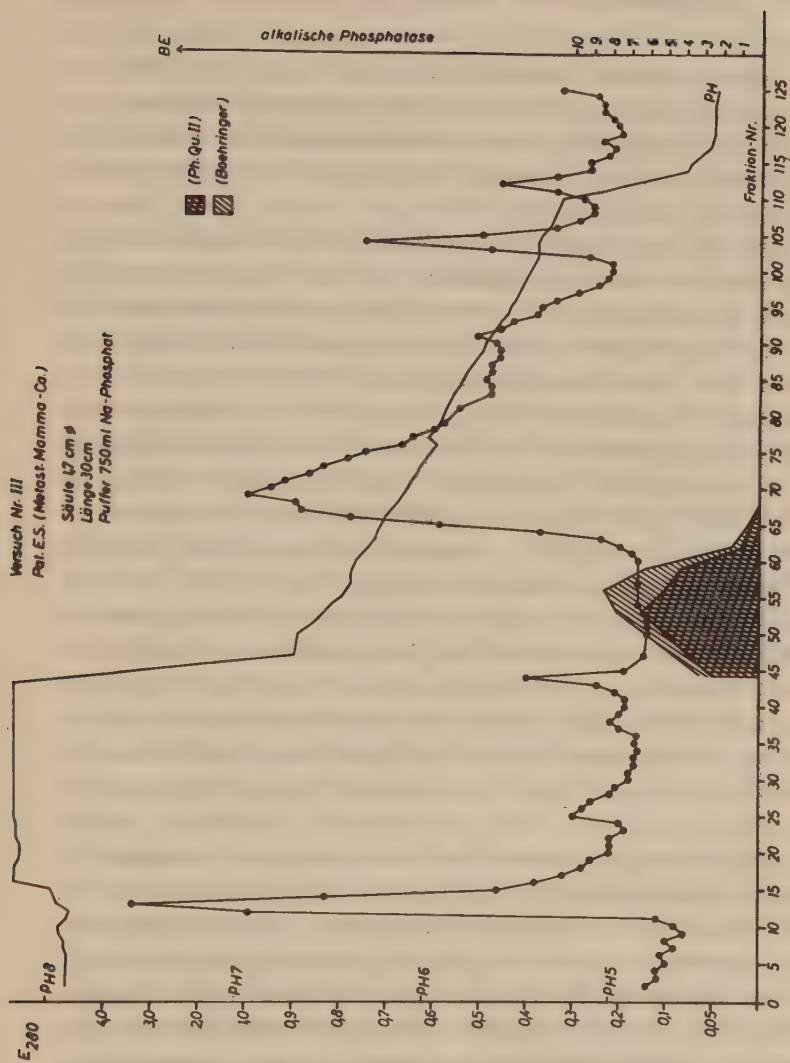
Röhrchen Nr.	Phosphatabs BE	Qu.II Ext.	Ext.	Boehringer BE
55/57	5,1	0,120	0,386	8,4
58/60	4,2	0,090	0,290	6,2
61/63	1,0	0,017	0,097	1,5
64/66	0,5	0,007	0,034	0,6
67/69	-	-	0,021	0
70	-	-	0,013	0
71/73	-	-	0,023	0
74/76	-	-	0,026	0
77/79	-	-	0,013	0
103/105	1,1	0,02	0,085	1,3
146	-	-	-	-
147	-	-	-	-
148	-	-	-	-

Wie die Aufstellung zeigt, läßt sich für die alkalische Phosphatase eine gute Übereinstimmung der Meßergebnisse beider vollquantitativer Bestimmungsmethoden nachweisen.

In den folgenden Diagrammen ist die Eiweißkonzentration und Phosphatase-Aktivität (Ordinate) gegen die Röhrchenfraktionen (Abszisse) aufgetragen.







C S C H L U S S

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in ihrem ersten Teil mit einem Überblick über die Enzymkinetik und die physiologischen Bedingungen der sauren und alkalischen Serumphosphatasen. Ihm schließt sich eine Betrachtung über ihre klinische Bedeutung an.

Der zweite Teil ist den unterschiedlichen chemischen Nachweismethoden der Serumphosphatasen und der Frage einer möglichen Konvertierbarkeit ihrer Maßeinheiten gewidmet.

Der dritte Teil befaßt sich mit experimentellen Untersuchungen über eine neue halbquantitative Schnellbestimmungsmethode (Phosphatabs- Acid, -Alkaline). Sie wurde an Hand zweier vollquantitativer Methoden (a: Testcombination saure bzw. alkalische Phosphatase der Firma Boehringer, b: Phosphatabs-Acid, -Alkaline Quantitative der Warner-Chilcott Morris Plains N.J., bezogen von der Firma Gödecke) getestet. Trotz unterschiedlicher Substrate (a: p-Nitrophenylphosphat, b: α -Naphthylphosphat für die saure bzw. Phenolphthaleinphosphat für die alkalische Phosphatase) und Einheiten (a: Milli-Mol-Einheiten, b: Babson-Read-Einheiten für die saure, Bodansky-Einheiten für die alkalische Phosphatase) gelang mit Hilfe von Umrechnungsformeln ein Vergleich über die Bodansky-Einheit als gemeinsame Bezugseinheit. Dabei zeigte sich allgemein, daß ein Vergleich der Ergebnisse bei Bestimmung der sauren Phosphatase wesentlich schwieriger ist und nicht so verläßliche Aussagen wie bei der alkalischen Phosphatase gestattet. Immerhin ließ sich feststellen, daß beim Vergleich der halb- und vollquantitativen Phosphatabs-Methode die exakt bestimmten Werte der einzelnen Seren im Bereich der durch die Schnellmethode zugewiesenen Wertordnung lagen. Eine entsprechende Beziehung konnte nicht mit der gleichen Genauigkeit für die Werte der Testcombination der Fa. Boehringer hergestellt werden. Hier scheint vor allem die unterschiedliche Substrataffinität der beiden

verwandten Substrate zur sauren Prostata-Phosphatase eine besondere Rolle zu spielen. Sie soll beim α -Naphthylphosphat (Phosphatabs) besonders groß sein.

Bei der alkalischen Phosphatase zeigte sich eine ausgesprochen gute Vergleichsmöglichkeit beider vollquantitativer Methoden untereinander sowie mit der Schnellmethode. Der Vorteil des Schnelltestes liegt somit darin, in einer kurzen Zeit (12 Minuten Inkubationszeit bei 37°C) mit geringem technischen Aufwand das Gros der bei Routine-Untersuchungen anfallenden Seren in bezug auf die Serumphosphatasen in normale und pathologische zu klassifizieren. Damit lassen sich alle Seren mit normalen Werten ausschließen. Bei Seren mit erhöhten Aktivitätswerten empfiehlt sich eine anschließende Untersuchung mit einer vollquantitativen Methode zur genaueren Bestimmung.

Im zweiten Teil der experimentellen Untersuchungen testeten wir zwei neue Standardseren (Versatol-E, Versatol Pediatric) in bezug auf ihren Gehalt an Serumphosphatasen. Die angegebenen Werte ließen sich mit den von uns verwendeten Methoden innerhalb der zulässigen Normabweichung befriedigend genau erreichen. Außerdem schlugen wir eine von der Anwendungsvorschrift abweichende Berechnungsformel vor, mit der man den Standardwert eines Arbeitsgangs zur Korrektur der Werte der Patientenseren benutzen kann.

Schließlich haben wir zwei Patientenseren mit stark erhöhter saurer bzw. alkalischer Phosphatase-Aktivität säulenchromatographisch getrennt und die einzelnen Fraktionen auf ihren Gehalt an Phosphatasen untersucht. Dabei war für die saure Phosphatasenbestimmung nur das Substrat α -Naphthylphosphat (Phosphatabs-Acid Quantitative) zu verwenden, während zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase beide vollquantitativen Methoden gut vergleichbare Werte angaben.

Literaturhinweise

- (1) F. Leuthardt, Lehrbuch der physiol. Chemie, Verlag de Gruyter, 14. Auflage, 172-177
- (2) Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Verlag Georg Thieme, 1961, 56 ff.
- (3) Ammon/Dirscherl, Fermente, Hormone, Vitamine I Fermente, Thieme-Verlag, III. Auflage 1959, 88 ff.
- (4) Ulrich C. Dubach, Klinik der alkalischen Phosphatase, Praxis, 51. Jhg. No 44, 1106-1109
- (5) R. Richterich, Ultramikromethoden im klinischen Laboratorium VII. Bestimmung der sauren Phosphatase, SMW, 92 Nr.47, 1496-1500 (1962).
- (6) R. Hegglin, Differentialdiagnose Innerer Krankheiten, Thieme-Verlag, 8. Auflage 1963, 608
- (7) Andersch, M.A. und A. Szypinski, Amer. J. clin. Path. 17, 571 (1947)
- (8) Th. B. Gibbons, Hyperphosphatasaemia in Patients Without Jaundice With Hepatobiliary Disease, J.o.th. Amer. Med. Assoc., Vol 364, No 3, May 4, 1957
- (9) Lloyd M. Shupe, A Rapid Method for Detection of Seminal Stains Police - November-December 61
- (10) Babson, Die Bedeutung des Substrates für die Bestimmung der sauren Phosphatase Am.J.of clin.Path. (Vol 32:83-87, July 1959)
- (11) H. Südhof u. Mitarb. Zur Bestimmung der alkalischen und sauren Phosphatase im Serum. D.Med. Wsch. Jhg.87, No 5, 249-255 (1962)

- (12) H.U. Bergmeyer,
Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie
Weinheim, 779 (1962)
- (13) Bessey O.A., H.O. Lowry und M.J. Brock,
J. Biol. Chem. 164, 321 (1946)
- (14) R. Richterich, Die Wahl von Enzymeinheiten bei
diagnostischen Untersuchungen, Tabelle 1
Klin. Wschr. 39. Jhg. Heft 19, 987-989 (1961)
- (15) Brock und Wilmanns,
Ärztl. Lab. 5,33 (1959)
- (16) Linhardt, Röntgen- u. Laboratoriumspraxis 113 (1954)
- (17) H. Rein-M. Schneider,
Physiologie des Menschen,
Springer Verlag, (1960), 13. u. 14. Auflage, 32
- (18) R. Richterich,
Ultramikromethoden im Laboratorium
IV. Bestimmung der alkalischen Phosphatase
Schw. Med. Wschr. 92, Nr. 25, 781-783 (1962)
- (19) B. Klein, P.A. Read, A.L. Babson,
Clin. Chem. Vol. 6, No 3, 269, Juni 1960
- (20) King E.J. und D.M. Campbell,
Clin. chim. Acta 6, 301 (1961)
- (21) Huggins, G. u. P. Talalay:
J. biol. Chem. 159, 399 (1945)
- (22) Linhardt K. u. K. Walter
Z. physiol. Chem. 289. 245 (1952)
- (23) A.L. Babson,
Opportunities for Application of the Scientific
Method in the Routine Clinical Laboratory,
Am.J. of Med. Techn., Nov-Dec. (1960)

- (24) A.L. Babson,
The Interference of Bilirubin in Serum Phosphatase
Assays Using the Substrate p-Nitrophenyl Phosphate
Amer. J. of Techn. July-August (1962)
- (25) L. Heilmeyer, G. Mössner, W. Hunstein,
Die Lymphogranulomatose
D. Med. Wschr. 1957, 1048
- (26) Krauss, H.
Antwort auf Fragen aus der Praxis
D. Med. Wschr. 1958, 1373
- (27) Mössner, E.
Urologia internat. 2, 172-179 (1956)
- (28) Lester, R. Tuchmann
Amer. J. of Med. 27, 959-962 (1959)
- (29) Jeremian A. Barondess
Amer. J. of Med. 29, 43-54 (1960)
- (30) Greene, L. S.
Gastroenterology 40 (1961), 219
- (31) John B. Goetsch
J. Urol. (Baltimore) 84, 636-642, (1960)
- (32) Carl G. Peterson jr.
A simplified method for estimating Serum acid
Phosphatase,
J. of Urology, 85, Nr. 6, 1011-1013 (1961)
- (33) Raabe S.
Langenb. Arch. 273 (1953), 273
- (34) Brock N.
Ärztl. Lab. 2 (1956), 327
- (35) Eisfeld,
Med. Klin. (1963). 9: 367

- (36) Bodansky, A.
J. Biol. Chem.(Baltimore) 101 (1933), S. 93
- (37) Rass. Fisiopat. 29, 635-640 (1957)
- (38) N. Rosenberg,
Zone electrophoretic Studies of Serum alkaline
Phosphatase,
J.clin. Invest. 38,630-644 (1959) Vol 48
- (39) Lab. Invest. 11, 106-112 (1959)
- (40) J.clin. Path. 14,500 (1961)
- (41) J.L.Fahey,P.F. McCoy, Mehran Goulian,
Chromatography of Serum Proteins in normal and
pathologic Sera alkaline and acid Phosphatase.
J.Clin.Invest. Vol.37,No2,pp 272-284, February (1958)
- (42) Saher H.A., Gutter J.F., Wyckoff M.M. u. Peterson EA
J.Am.Chem. Soc. 78,756 (1956).
- (43) Grassmann W. u. Hannig K.
Naturwiss. 37, 496 (1950)
- (44) Michaelis L.:
Biochem.Z.234,139 (1931)
- (45) Grassmann W., Hannig K., Knedel M.
Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestim-
mung der Serumproteine auf Filtrierpapier.
D. Med. Wschr. 76, 333 (1951)
- (46) Knedel M.,
Plasma 1, 87 (1953)

Verdankungen

Herrn Prof. Dr.H. SCHWIEGK danke ich für die Ermöglichung der Durchführung meiner Arbeit an seiner Klinik.

Herrn Priv.Doiz.Dr.M. KNEDEL bin ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie für zahlreiche Anregungen und eine großzügige Unterstützung bei der Ausführung meiner experimentellen Untersuchungen in seinem Labor zu tiefem Dank verpflichtet.

Für die tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der säulenchromatographischen Untersuchungen schulde ich Herrn und Frau Dr. FATEH-MOGHADAM meinen verbindlichsten Dank.

L e b e n s l a u f

Am 3. November 1938 bin ich, Rolf Lamerz, als Sohn des Kaufmanns Paul Lamerz und seiner Ehefrau Maria in Düsseldorf geboren. Meine Kindheit verbrachte ich in Rheydt im Rheinland. Dort wurde ich Ostern 1946 in die katholische Volksschule in der Dahlemerstraße eingeschult. Nach Beendigung des vierten Schuljahres besuchte ich das Städtische neusprachliche Gymnasium derselben Stadt und gehörte ihm bis zur Unterprima an. Als meine Eltern aus beruflichen Gründen ihren Wohnsitz nach Düsseldorf verlegten, wechselte ich im Juli 1957 zum Städtischen Humboldt-Gymnasium der Landeshauptstadt über. Dort habe ich im März 1959 meine Reifeprüfung abgelegt.

Meiner Neigung zum Arztberuf folgend, immatrikulierte ich mich im Sommersemester 1959 an der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau. Hier legte ich nach zwei Semestern die naturwissenschaftliche Prüfung ab. Nach einem weiteren folgte ich meinen Eltern, die inzwischen in Rottach-Egern ansässig geworden waren, nach Bayern und setzte mein Studium an der Maximilians-Universität München fort. Mit Abschluß der ärztlichen Vorprüfung im Herbst 1961 begann der für mich interessantere klinische Teil meiner Ausbildung. Nach einer Famulatur auf der Inneren Abteilung des Krankenhauses r.d. Isar arbeitete ich während des SS 62 und des WS 62/63 in der I. Medizinischen Universitätsklinik München an meiner Doktor-Dissertation. Meine Bemühungen, vermittelte Theorie mit der Praxis am Krankenbett in Einklang zu bringen, führten mich im SS 63 als Famulus für drei Monate nach Frankreich (Nantes, Paris, Tours). Im Anschluß an mein 6. klinisches Fachsemester absolvierte ich im Wintersemester 1964/65 meine ärztliche Prüfung.

Im März 1965 begann ich meine Medizinalassistentenzeit an der Chirurgischen Maria-Theresia-Klinik München (Prof. Tauber). Der viermonatigen Pflichtzeit folgten vom Juli

1965 bis Januar 1966 sechs Monate Innere Medizin an der I. Medizinischen Universitätsklinik München. Seit Februar 1966 bin ich als Medizinalassistent an der I. Universitäts-Frauenklinik München tätig.

